

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de Novas Metodologias Analíticas  
para a Identificação de Novas Substâncias Psicoativas  
em Matrizes Biológicas**

Mónica Sofia Soares Antunes

**Mestrado em Química**  
Especialização em Química, Saúde e Nutrição

Dissertação orientada por:  
Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar  
Mário Jorge Dinis Barroso

2018

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de Novas Metodologias Analíticas  
para a Identificação de Novas Substâncias Psicoativas  
em Matrizes Biológicas**

Mónica Sofia Soares Antunes

**Mestrado em Química**  
Especialização em Química, Saúde e Nutrição

Dissertação orientada por:  
Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar  
Mário Jorge Dinis Barroso

2018

*Aos meus avós.*

## **Agradecimentos**

O meu primeiro agradecimento não podia deixar de ir para a instituição que me fez sentir em casa nos últimos cinco anos. Ser aluna da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa foi um orgulho, e levarei cada momento que passei dentro destas paredes para o resto da minha vida.

Não posso dizer diferente da instituição que me acolheu nestes últimos meses. Estagiar na Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses foi o realizar de um sonho, e não podia acabar esta etapa de coração mais cheio.

À Doutora Helena Gaspar, o maior dos meus obrigados, por me ter impulsionado a seguir o caminho que me fez entrar em Química. Pela paciência e pelo perfeccionismo que me fez exigir sempre o melhor de mim.

Ao Doutor Mário Barroso, pela boa disposição que me animou quase todos os dias, por me manter calma quando os prazos começaram a apertar, por me fazer sentir tão em casa e por me ter orientado de forma tão simples e descontraída.

A toda a equipa do Serviço de Química e Toxicologia Forense do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses, um obrigada do tamanho do mundo, em especial ao Diretor do Serviço Mestre João Miguel Franco, por me fazer sentir tão bem vinda e por me abrir as portas a este estágio. Um agradecimento especial ao Dr. Francisco Vale, pelo sorriso constante, ao Dr. Nuno Gonçalves, pelo ritmo e animação que nunca faltaram, à Mestre Suzana Fonseca, pela simpatia infinita, ao Dr. Antonio Castañera, pelas conversas aleatórias que fomos tendo e à Mestre Susana Simões, pelo companheirismo dentro do Laboratório. Um obrigada do fundo do coração à Mestre Suzel Costa, pelas críticas construtivas e pelo interesse que demonstrou no meu trabalho, por me incluir em vários processos do laboratório porque achava que eu ia gostar de aprender e pelo afeto que lhe ganhei na partilha do aparelho de GC-MS.

À Professora Susana Santos, um obrigada não chega. Não teria sido possível sintetizar o padrão em falta sem a sua ajuda, e não teria podido pedir melhor orientação.

Ao Senhor Rui Matheus, pela disponibilidade em ajudar num dos passos da síntese, e pela presença constante nos corredores nestes últimos cinco anos. Não é alguém que irei algum dia esquecer.

Um grande obrigada à Professora Cristina Moiteiro, pela ajuda a criar a linha de vácuo que foi tão imprescindível para o processo de síntese. À Doutora Sílvia Carvalho e ao meu amigo Paulo Vieira, pela ajuda dentro do laboratório.

Um agradecimento especial ao Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária por ceder as amostras padrão dos meus compostos. Um obrigada à minha colega Margarida Sequeira que, nesta instituição, realizou análises de GC-MS e GC-FID aos compostos estudados.

À minha tia Áurea, à minha prima Zeta e à princesa Mara, pelos dias de descanso que me proporcionaram por duas vezes neste Verão e que tanto me ajudaram a recuperar forças.

À Beatriz Godinho, a melhor amiga que podia pedir, por me mostrar que não é preciso uma presença física constante para ter o apoio incondicional que tanta falta faz.

Aos meus amigos que percorreram comigo o meu percurso académico, por me encherem de boas memórias que vou levar para a vida. Francisco Mota, Vítor Martins, Andreia Fortuna, João Pais, Paulo Vieira, Sílvia Cardoso, Miguel Silva, Bruno Henriques, João Ramos – sem vocês não teria sido o mesmo.

Todo o meu coração ao Gabriel Martins. Sem ele era impossível. Obrigada por seres o meu pilar, por me levatares quando caio, por me fazeres ver-me pelos teus olhos, que me vêm tão melhor que os meus. Na minha licenciatura disse que sem ti era difícil, mas não impossível, mas está cada vez a ser mais difícil fazer seja o que for sem ti. Obrigada. A sério.

O maior dos obrigados à minha maravilhosa família, por tentarem ouvir as minhas mil e uma explicações da minha tese, apesar de não entenderem uma palavra. À minha mãe pelos fins-de-semana que me fizeram desanuviar e por nunca me fazer esquecer de descansar. Ao meu pai por querer sempre o meu sucesso e torcer por mim com todas as forças que tem, apesar de entender zero daquilo que eu faço. Ao meu irmão por ser o meu braço direito em todos os aspetos da minha vida e mais alguns, por me fazer rir todos os dias e por fazer um trabalho tão bom em ser metade de mim. Tenho os melhores pais e o melhor irmão do mundo.

## Resumo

Este trabalho foi realizado no âmbito do protocolo de colaboração desenvolvido entre a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC/PJ) e o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), que tem como objetivo o estudo de novas substâncias psicoativas (NSP) em Portugal tendo em conta o Decreto-Lei nº 54/2013 de 17 de abril.

O termo NSP diz respeito a substâncias psicoativas que surgem no mercado de drogas ilícitas mas que não são controladas pelas convenções internacionais, constituindo uma ameaça à saúde pública. O seu controlo por parte das autoridades tem sido desafiante tendo em conta o surgimento de novas substâncias aquando da legislação imposta a outras. Desta forma, é imperativo o desenvolvimento de métodos de identificação e quantificação para estes compostos na rotina dos laboratórios de toxicologia forense.

Esta dissertação teve assim como objetivo a validação de um método analítico de identificação e quantificação em amostras de sangue total de cinco catinonas sintéticas (4-CEC,  $\alpha$ -PVP, metilona, 4-Cl-PVP e MDPV) que já foram apreendidas em Portugal, de modo a serem inseridos na rotina laboratorial. O método foi realizado através de análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) em modo de monitorização seletiva de iões (SIM), e após extração dos analitos por extração em fase sólida (SPE) e posterior derivatização.

Não foi possível dar-se a validação do método analítico para a molécula de metilona, que revelou baixa sensibilidade nas concentrações de trabalho, originando fragmentos iónicos pouco abundantes. Em relação aos restantes compostos, registou-se linearidade do método analítico de 25 (limite de quantificação) a 800 ng/mL, tendo-se verificado coeficientes de determinação superiores a 0,99 para todos os analitos. Os limites de deteção foram de 5 ng/mL para as moléculas de  $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP e MDPV e de 25 ng/mL para a molécula de 4-CEC. O método foi considerado seletivo, preciso e exato para todos os analitos, cumprindo os critérios aceites para a validação de métodos bioanalíticos. A eficiência da extração foi superior a 85% para todos os analitos em estudo e foi também estudada a estabilidade dos compostos, provando-se ser a MDPV a catinona mais estável, seguida da  $\alpha$ -PVP, da 4-Cl-PVP e, por fim, da 4-CEC. Não foram observados fenómenos de arrastamento e o método foi robusto.

O método analítico desenvolvido e validado foi aplicado a amostras reais que tinham dado positivas para anfetaminas, mas não foram encontradas amostras positivas para as catinonas em estudo.

Da mesma forma, o método foi aplicado a amostras brancas fortificadas de urina, na tentativa de validar o método para a análise desta matriz biológica, mas não foram obtidos resultados satisfatórios.

Palavras-chave: NSP; Catinonas sintéticas; SPE; GC-MS; Validação.

## Abstract

This work was carried out within the scope of the protocol of collaboration between Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), Laboratório da Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC/PJ) and Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), which aims at studying new psychoactive substances (NPS) in Portugal, following the law decree number 54/2013 of April 17th.

The term NPS refers to psychoactive substances that appear on the illicit drug market but are not controlled by international conventions and constitute a threat to public health. Their control by the authorities has been challenging, since new substances appear as a consequence of legislation imposed on others. Therefore, it is imperative to develop methods for the identification and quantification of these compounds in the routine of forensic toxicology laboratories.

This dissertation aimed at validating an analytical method for the identification and quantification of five synthetic cathinones (4-CEC,  $\alpha$ -PVP, methylone, 4-Cl-PVP and MDPV), already seized in Portugal, in whole blood samples in order to be inserted in laboratory routine. The method used gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in the selective ion monitoring (SIM) mode after previous extraction and concentration of the analytes by solid phase extraction (SPE) and chemical derivatization.

It was not possible to validate the analytical method for methylone, which revealed low sensitivity at the working concentrations, resulting in low abundance ionic fragments. For the remaining compounds, the analytical method was linear from 25 (limit of quantification) to 800 ng/mL, with coefficients of determination higher than 0.99 for all analytes. Limits of detection were 5 ng/mL for  $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP and MDPV, and 25 ng/mL for 4-CEC. The method was considered selective, precise and accurate for all analytes, meeting accepted criteria for the validation of bioanalytical methods. The extraction efficiency was higher than 85% for all analytes and the stability of the compounds was also studied, proving MDPV to be the most stable cathinone, followed by  $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP and, lastly, 4-CEC. No carryover phenomenon was observed and the method was robust.

The analytical method that was developed and validated was then applied to real samples that previously tested positive for amphetamines, but no positive samples were found for the cathinones under study.

In the same way, the method was applied to blank urine samples, in an attempt to validate the method for the analysis of these biological matrices, but no satisfactory results were obtained.

**Keywords:** NPS; Synthetic cathinones; SPE; GC-MS; Validation.

## Índice

1. Introdução Teórica .....	1
1.1. Novas Substâncias Psicoativas .....	1
1.1.1. Riscos Associados ao Consumo de Novas Substâncias Psicoativas .....	3
1.1.2. Legislação em Portugal e na Europa .....	4
1.1.3. Catinonas Sintéticas .....	6
1.2. Métodos de Identificação e Análise de Catinonas.....	8
1.2.1. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa .....	9
1.2.2. Amostras Biológicas.....	12
1.2.3. Extração em Fase Sólida .....	13
1.2.4. Validação de Métodos Analíticos.....	17
1.3. Revisão Bibliográfica.....	19
1.4. Justificação do Tema e Objetivos.....	23
2. Parte Experimental .....	25
2.1. Obtenção dos Padrões das Cinco Catinonas em Estudo.....	25
2.1.1. Reagentes, Equipamentos e Procedimentos Experimentais .....	25
2.1.2. Síntese do Padrão de MDPV .....	26
2.1.3. Caracterização Estrutural dos Compostos em Estudo .....	31
2.2. Desenvolvimento e Validação do Método Analítico.....	32
2.2.1. Reagentes .....	33
2.2.2. Soluções .....	33
2.2.3. Equipamentos e Materiais .....	34
2.2.4. Condições Cromatográficas .....	36
2.2.5. Amostras Biológicas.....	36
2.2.6. Identificação dos Compostos.....	36
2.2.7. Otimização do Método Analítico .....	37
2.2.8. Quantificação.....	38
2.2.9. Derivatização Química .....	38
2.2.10. Extração em Fase Sólida .....	39
2.2.10.1. Pré-Tratamento das Amostras Biológicas .....	39
2.2.10.2. Metodologia de Extração em Fase Sólida .....	39
2.2.11. Validação do Método de Ensaio para Análise de Catinonas por SPE/GC-MS .....	40
2.2.11.1. Avaliação da Seletividade .....	40
2.2.11.2. Gama de Trabalho .....	40



2.2.11.3.	Linearidade e Modelo de Calibração.....	41
2.2.11.4.	Limites de Detecção.....	42
2.2.11.5.	Limites de Quantificação.....	42
2.2.11.6.	Estabilidade.....	42
2.2.11.7.	Precisão: Repetibilidade, Reprodutibilidade e Precisão Intermédia.....	43
2.2.11.8.	Exatidão.....	44
2.2.11.9.	Recuperação da Fase de Extração (Eficiência da Extração).....	45
2.2.11.10.	Robustez.....	45
2.2.11.11.	Avaliação do Fenómeno de Arrastamento ( <i>Carryover</i> ).....	45
2.2.12.	Análise de Amostras Reais.....	46
2.2.13.	Aplicação do Procedimento de Extração a Amostras de Urina.....	46
3.	Apresentação e Discussão dos Resultados.....	47
3.1.	Identificação dos Compostos.....	47
3.2.	Otimização do Método Analítico.....	48
3.3.	Escolha do Padrão Interno.....	48
3.4.	Derivatização Química.....	49
3.5.	Metodologia de Extração em Fase Sólida.....	50
3.6.	Validação do Método Analítico de Ensaio para Análise de Catinonas por SPE/GC-MS.....	51
3.6.1.	Avaliação da Seletividade.....	51
3.6.2.	Linearidade e Modelo de Calibração.....	53
3.6.3.	Limites de Detecção.....	53
3.6.4.	Limites de Quantificação.....	54
3.6.5.	Estabilidade.....	54
3.6.6.	Precisão (Repetibilidade, Reprodutibilidade e Precisão Intermédia) e Exatidão.....	56
3.6.7.	Recuperação da Fase de Extração (Eficiência da Extração).....	58
3.6.8.	Robustez.....	59
3.6.9.	Avaliação do Fenómeno de Arrastamento ( <i>Carryover</i> ).....	60
3.7.	Análise de Amostras Reais.....	60
3.8.	Aplicação do Procedimento de Extração a Amostras de Urina.....	61
4.	Considerações Finais.....	63
5.	Referências Bibliográficas.....	65
6.	Anexos.....	73

## Índice de Figuras

Figura 1.1: Número e principais grupos de NSP notificadas pela primeira vez ao mecanismo de alerta rápido da União Europeia, de 2005 a 2017 [Adaptado de 11].....	2
Figura 1.2: Possibilidade de prisão por posse de drogas para uso pessoal (delito menor) [Adaptado de 20].....	5
Figura 1.3: Estrutura da (a) catinona e da (b) anfetamina.....	7
Figura 1.4: Exemplo de síntese de catinonas sintéticas.....	8
Figura 1.5: Esquema de fragmentações de uma catinona por EI [39].....	11
Figura 1.6: Cinco etapas do processo de extração em fase sólida [Adaptado de 55].....	15
Figura 2.1: Esquema global das quatro etapas envolvidas na síntese de MDPV na forma de cloridrato....	27
Figura 2.2: Estrutura numerada da piperonilbutilcetona.....	28
Figura 2.3: Estrutura numerada da piperonilbromobutilcetona.....	29
Figura 2.4: Esquema para a extração da MDPV na forma de base livre.....	30
Figura 2.5: Estrutura numerada das moléculas de (a) 4-CEC, (b) $\alpha$ -PVP, (c) metilona, (d) 4-Cl-PVP e (e) MDPV.....	31
Figura 6.1: Mecanismo de formação de uma imina intermediária por adição nucleofílica de piperonilnitrilo a cloreto de butilmagnésio.....	73
Figura 6.2: Mecanismo de formação da cetona de partida após hidrólise da imina intermediária.....	73
Figura 6.3: Espectro NMR $^{13}\text{C}$ APT da piperonilbutilcetona.....	74
Figura 6.4: Espectro NMR $^1\text{H}$ da piperonilbutilcetona.....	74
Figura 6.5: Espectro NMR $^1\text{H}$ da piperonilbutilcetona (ampliação).....	74
Figura 6.6: Espectro NMR $^1\text{H}$ da piperonilbutilcetona (ampliação).....	75
Figura 6.7: Espectro NMR HMBC da piperonilbutilcetona.....	75
Figura 6.8: Espectro NMR HMBC da piperonilbutilcetona (ampliação).....	75
Figura 6.9: Espectro NMR COSY da piperonilbutilcetona.....	76
Figura 6.10: Mecanismo de $\alpha$ -halogenação da piperonilbutilcetona, que forma a piperonilbromobutilcetona.....	76
Figura 6.11: Espectro NMR $^{13}\text{C}$ APT da piperonilbromobutilcetona.....	77
Figura 6.12: Espectro NMR $^1\text{H}$ da piperonilbromobutilcetona.....	77
Figura 6.13: Espectro NMR $^1\text{H}$ da piperonilbromobutilcetona (ampliação).....	77
Figura 6.14: Espectro NMR HSQC editado da piperonilbromobutilcetona.....	78
Figura 6.15: Espectro NMR HMBC da piperonilbromobutilcetona.....	78
Figura 6.16: Espectro NMR HMBC da piperonilbromobutilcetona (ampliação).....	78

Figura 6.17: Espectro NMR COSY da piperonilbromobutilcetona.....	79
Figura 6.18: Mecanismo SN2 entre a piperonilbromobutilcetona e a pirrolidina, que culmina na formação de MDPV na forma de base livre.....	79
Figura 6.19: Formação do MDPV na forma de cloridrato pela adição de ácido clorídrico etéreo ao MDPV em forma de base livre.....	79
Figura 6.20: Espectro NMR <sup>13</sup> C APT da 4-CEC.....	80
Figura 6.21: Espectro NMR <sup>1</sup> H da 4-CEC.....	80
Figura 6.22: Espectro NMR <sup>1</sup> H da 4-CEC (ampliação).....	81
Figura 6.23: Espectro NMR HMBC da 4-CEC.....	81
Figura 6.24: Espectro NMR HMBC da 4-CEC (ampliação).....	81
Figura 6.25: Espectro NMR HMBC da 4-CEC (ampliação).....	82
Figura 6.26: Espectro NMR COSY da 4-CEC.....	82
Figura 6.27: Cromatograma GC-FID da análise 5 da 4-CEC.....	82
Figura 6.28: Espectro NMR <sup>13</sup> C APT da $\alpha$ -PVP.....	83
Figura 6.29: Espectro NMR <sup>1</sup> H da $\alpha$ -PVP.....	83
Figura 6.30: Espectro NMR <sup>1</sup> H da $\alpha$ -PVP (ampliação).....	83
Figura 6.31: Espectro NMR <sup>1</sup> H da $\alpha$ -PVP (ampliação).....	84
Figura 6.32: Espectro NMR HSQC editado da $\alpha$ -PVP.....	84
Figura 6.33: Espectro NMR HSQC editado da $\alpha$ -PVP (ampliação).....	84
Figura 6.34: Espectro NMR HMBC da $\alpha$ -PVP.....	85
Figura 6.35: Espectro NMR COSY da $\alpha$ -PVP.....	85
Figura 6.36: Cromatograma GC-FID da análise 6 da $\alpha$ -PVP.....	85
Figura 6.37: Espectro NMR <sup>13</sup> C APT da metilona.....	86
Figura 6.38: Espectro NMR <sup>1</sup> H da metilona.....	86
Figura 6.39: Espectro NMR <sup>1</sup> H da metilona (ampliação).....	86
Figura 6.40: Espectro NMR HSQC editado da metilona.....	87
Figura 6.41: Espectro NMR HMBC da metilona.....	87
Figura 6.42: Espectro NMR HMBC da metilona (ampliação).....	87
Figura 6.43: Espectro NMR COSY da metilona.....	88
Figura 6.44: Cromatograma GC-FID da análise 5 da metilona.....	88
Figura 6.45: Espectro NMR <sup>13</sup> C APT da 4-Cl-PVP.....	88
Figura 6.46: Espectro NMR <sup>1</sup> H da 4-Cl-PVP.....	89
Figura 6.47: Espectro NMR <sup>1</sup> H da 4-Cl-PVP (ampliação).....	89
Figura 6.48: Espectro NMR HSQC editado da 4-Cl-PVP.....	89

Figura 6.49: Espectro NMR HSQC editado da 4-Cl-PVP (ampliação).....	90
Figura 6.50: Espectro NMR HMBC da 4-Cl-PVP.....	90
Figura 6.51: Espectro NMR HMBC da 4-Cl-PVP (ampliação).....	90
Figura 6.52: Espectro NMR HMBC da 4-Cl-PVP (ampliação).....	91
Figura 6.53: Espectro NMR COSY da 4-Cl-PVP.....	91
Figura 6.54: Cromatograma GC-FID da análise 2 da 4-Cl-PVP.....	91
Figura 6.55: Espectro NMR <sup>13</sup> C APT da MDPV.....	92
Figura 6.56: Espectro NMR <sup>1</sup> H da MDPV.....	92
Figura 6.57: Espectro NMR <sup>1</sup> H da MDPV (ampliação).....	92
Figura 6.58: Espectro NMR HSQC editado da MDPV.....	93
Figura 6.59: Espectro NMR HSQC editado da MDPV (ampliação).....	93
Figura 6.60: Espectro NMR HMBC da MDPV.....	93
Figura 6.61: Espectro NMR HMBC da MDPV (ampliação).....	94
Figura 6.62: Espectro NMR COSY da MDPV.....	94
Figura 6.63: Cromatograma GC-FID da análise 3 da MDPV.....	94
Figura 6.64: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-CEC.....	95
Figura 6.65: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da $\alpha$ -PVP.....	95
Figura 6.66: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da metilona.....	96
Figura 6.67: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-Cl-PVP.....	96
Figura 6.68: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da MDPV.....	97
Figura 6.69: Cromatogramas obtidos no estudo da linearidade numa MACRO desenvolvida internamente (600 ng/mL).....	97
Figura 6.70: Folha de cálculo usada no SQTF do INMLCF para confirmação qualitativa dos compostos em estudo (por ordem: 4-CEC, $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP e MDPV).....	98
Figura 6.71: Comparação das curvas de calibração da molécula de MDPV usando como padrão interno benzoilecgonina-d <sub>3</sub> (em cima) e cocaína-d <sub>3</sub> (em baixo).....	99
Figura 6.72: Cromatograma da mistura de catinonas usando como reagente de derivatização MBTFA.....	100
Figura 6.73: Cromatograma (em cima) e espectro de massa (em baixo) da molécula de metilona na mistura de catinonas usando como reagente de derivatização MSTFA:TMCS (95;5, v/v).....	100
Figura 6.74: Comparação dos cromatogramas obtidos das amostras 1 (Oasis® MCX), 5, 7, 9 e 11 (Oasis® HLB).....	101
Figura 6.75: Cromatogramas obtidos usando como eluente diclorometano:metanol (70:30, v/v), isopropanol e metanol.....	101

Figura 6.76: Cromatograma obtido por SPE/GC-MS da amostra 1 (cima) e da amostra 6 (baixo).....	102
Figura 6.77: Comparação das curvas de calibração da molécula de 4-CEC usando sete calibradores (25, 50, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/mL, em cima) e usando seis calibradores (25, 50, 200, 400, 600, 800 ng/mL, em baixo).....	104
Figura 6.78: Comparação dos cromatogramas obtidos a 600 ng/mL e a 5, 10, 15 e 20 ng/mL.....	105
Figura 6.79: Folhas de cálculo usadas para confirmação qualitativa dos compostos em estudo numa concentração de 5 ng/mL (por ordem, $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP e MDPV).....	106
Figura 6.80: Comparação dos cromatogramas obtidos nas soluções fortificadas deixadas à temperatura ambiente de um dia para o outro (cima) com uma análise realizada no mesmo dia, ambas com uma concentração de 500 ng/mL.....	107
Figura 6.81: Comparação dos cromatogramas obtidos nas soluções fortificadas deixadas no congelador durante três meses com uma análise realizada no mesmo dia, ambas com uma concentração de 500 ng/mL.....	107
Figura 6.82: Comparação dos cromatogramas obtidos nas soluções fortificadas deixadas no congelador durante três meses, tendo sido descongeladas e voltadas a congelar várias vezes com uma análise realizada no mesmo dia, ambas com uma concentração de 500 ng/mL.....	108
Figura 6.83: Cromatogramas de amostras extraídas antes e depois da extração, a uma concentração de 500 ng/mL.....	109
Figura 6.84: Comparação de um cromatograma de uma alíquota de sangue branco (cima) com uma alíquota de sangue branco fortificada com 600 ng/mL das catinonas em estudo.....	114
Figura 6.85: Comparação entre uma amostra branca fortificada com 600 ng/mL da mistura de cinco catinonas (cima) com a amostra real número 5.....	115
Figura 6.86: Curvas de calibração da $\alpha$ -PVP (em cima), da 4-Cl-PVP (a meio) e da MDPV (em baixo) obtidas através dos resultados da aplicação do método validado em sangue para amostras de urina.....	116

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Parâmetros de validação necessários para a validação de um método analítico qualitativo e quantitativo [66].....	17
Tabela 1.2: Informações gerais sobre a metilona.....	20
Tabela 1.3: Informações gerais sobre a MDPV.....	21
Tabela 1.4: Informações gerais sobre a $\alpha$ -PVP.....	22
Tabela 1.5: Informações gerais sobre a 4-CEC.....	22
Tabela 1.6: Informações gerais sobre a 4-CI-PVP.....	23
Tabela 1.7: Revisão bibliográfica dos métodos validados em matrizes biológicas das catinonas em estudo.....	23
Tabela 2.1: Intervalos máximos de tolerância permitidos para as intensidades relativas dos iões de diagnóstico monitorizados em modo SIM [85].....	37
Tabela 2.2: Análise de variância (tabela ANOVA) para o modelo experimental usado no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia.....	44
Tabela 2.3: Cálculo das estimativas das variâncias para o modelo experimental utilizado no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia.....	44
Tabela 3.1: Razão massa carga dos fragmentos iónicos dos iões diagnóstico monitorizados em modo SIM e tempos de retenção usados na identificação dos compostos derivatizados com MSTFA:TMCS (95:5, v/v). Os fragmentos usados na análise quantitativa encontram-se assinalados a negrito.....	47
Tabela 3.2: Identificação da MDPV numa amostra branca de sangue total fortificada com 25 ng/mL da mistura das cinco catinonas em estudo, à qual se adicionaram 250 ng/mL de padrão interno.....	48
Tabela 3.3: Diferentes tipos de metodologia de SPE testados na otimização do método analítico (os reagentes de lavagem encontram-se sublinhados).....	50
Tabela 3.4: Amostras analisadas no estudo da seletividade.....	52
Tabela 3.5: Composição das amostras de anfetaminas, analgésicos opioides, canabinóides e cocaína analisadas no estudo da seletividade.....	53
Tabela 3.6: Resumo dos resultados obtidos pelo método de regressão linear para as catinonas em estudo.....	53
Tabela 3.7: Degradação dos analitos em estudo no estudo da estabilidade. Os resultados desprezados encontram-se destacados com as linhas a cinzento.....	56
Tabela 3.8: Resultados obtidos no estudo da repetibilidade do método ( <i>intraday</i> , n = 6). Os resultados considerados <i>outliers</i> encontram-se encontram-se destacados com as linhas a cinzento.....	57
Tabela 3.9: Resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade do método ( <i>inter-day</i> , n = 5).....	58

Tabela 3.10: Resultados obtidos no estudo da precisão intermédia do método ( <i>combined intra and interday</i> , n = 15). Os resultados considerados <i>outliers</i> encontram-se destacados com as linhas a cinzento.....	58
Tabela 3.11: Recuperação média (%) da fase de extração, para cada um dos analitos para três níveis de concentração.....	59
Tabela 3.12: Amostras reais analisadas pelo método analítico desenvolvido.....	61
Tabela 6.1: Valores da interseção, do declive, do coeficiente de correlação e do coeficiente de determinação obtidos nos cinco dias do estudo da linearidade.....	103
Tabela 6.2: Cálculos efetuados no estudo da recuperação média da molécula de 4-CEC.....	110
Tabela 6.3: Cálculos efetuados no estudo da recuperação média da molécula de $\alpha$ -PVP.....	111
Tabela 6.4: Cálculos efetuados no estudo da recuperação média da molécula de 4-Cl-PVP.....	112
Tabela 6.5: Cálculos efetuados no estudo da recuperação média da molécula de MDPV.....	113

## Índice de Anexos

Anexo A: Síntese do Padrão de MDPV.....	73
Anexo B: Caracterização Estrutural dos Compostos em Estudo.....	80
Anexo C: Identificação dos Compostos.....	95
Anexo D: Escolha do Padrão Interno.....	99
Anexo E: Derivatização Química.....	100
Anexo F: Metodologia de Extração em Fase Sólida.....	101
Anexo G: Avaliação da Seletividade.....	102
Anexo H: Linearidade e Modelo de Calibração.....	103
Anexo I: Limites de Detecção.....	105
Anexo J: Estabilidade.....	107
Anexo L: Recuperação.....	109
Anexo M: Avaliação do Fenómeno de Arrastamento ( <i>Carryover</i> ).....	114
Anexo N: Análise de Amostras Reais.....	115
Anexo O: Aplicação do Procedimento de Extração a Amostras de Urina.....	116



## Abreviaturas e Símbolos

<b>1D</b>	Técnica(s) Unidimensional(ais)
<b>2D</b>	Técnica(s) Bidimensional(ais)
<b>4-CEC</b>	( <i>RS</i> )-1-(4-clorofenil)-2-(etilamino)-1-propanona
<b>4-CI-PVP</b>	( <i>RS</i> )-1-(4-clorofenil)-2-(1-pirrolidinil)-1-pentanona
<b>11-OH-THC</b>	11-hidroxi-tetra-hidrocanabinol
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>APT</b>	<i>Attached Proton Test</i>
<b>CI</b>	<i>Chemical Ionization</i> (Ionização Química)
<b>COSY</b>	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<b>Cq</b>	Carbono Quaternário
<b>CV</b>	Coefficiente de Variação
<b><i>d</i></b>	Dupleto
<b><i>dd</i></b>	Dupleto de Dupletos
<b>DLLME</b>	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva)
<b>ECD</b>	<i>Electron Capture Detector</i> (Detetor de Captura Eletrónica)
<b>EI</b>	<i>Electron Ionization</i> (Ionização por Impacto Eletrónico)
<b>EMCDDA</b>	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i> (Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência)
<b>EME</b>	Ecgonina Metil Ester
<b>ER</b>	Erro Relativo
<b>EUROPOL</b>	<i>European Union's Law Enforcement Agency</i> (Serviço Europeu de Polícia)
<b>eV</b>	Eletrão Volt
<b>EWS</b>	<i>Early Warning System</i> (Sistema de Alerta Rápido)
<b>FCUL</b>	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
<b>FID</b>	<i>Flame Ion Detector</i> (Detetor de Ionização de Chama)
<b>FO</b>	Fase Orgânica
<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa)
<b>HFBA</b>	Anidrido Heptafluorbutírico
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>INMLCF</b>	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

<b>IS</b>	<i>Internal Standard</i> (Padrão Interno)
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>JWH-210</b>	<i>N</i> -ácido pentanóico
<b>LC-HRMS</b>	<i>Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry</i>
<b>LC-MS</b>	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa)
<b>LC-Q/TOF</b>	<i>Liquid Chromatography-Quadrupole/Time of Flight</i>
<b>LLE</b>	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extração Líquido-Líquido)
<b>LOD</b>	<i>Limit of Detection</i> (Limite de Detecção)
<b>LOQ</b>	<i>Limit of Quantification</i> (Limite de Quantificação)
<b>LPC/PJ</b>	Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária
<b><i>m</i></b>	Multiplete
<b>MBTFA</b>	<i>N</i> -metil-bis-trifluoroacetamida
<b>MDA</b>	Metilenedioxianfetamina
<b>MDEA</b>	Metildietanolamina
<b>MDMA</b>	3,4-metilenodioximetanfetamina ( <i>ecstasy</i> )
<b>MBDB</b>	<i>N</i> -metil-1-(benzodioxol-5-il)-2-butanamina
<b>MDPV</b>	( <i>RS</i> )-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-pirrolidinil-1-pentanona
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>MSTFA</b>	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -trimetilsilil-trifluoroacetamida
<b><i>m/z</i></b>	Razão Massa/Carga
<b>NMR</b>	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
<b>NPD</b>	<i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i> (Detetor de Azoto e Fósforo)
<b>NSP</b>	Nova(s) Substância(s) Psicoativa(s)
<b>PFPA</b>	Anidrido Pentafluoropropiónico
<b><i>q</i></b>	Quarteto
<b><i>r</i></b>	Coeficiente de Correlação Linear
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de Determinação
<b><i>s</i></b>	Singuleto
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> (Desvio Padrão)
<b>SI</b>	Precisão Intermédia
<b>SICAD</b>	Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
<b>SIM</b>	<i>Selective Ion Monitoring</i> (Monitorização Seletiva de Iões)
<b>S/N</b>	<i>Signal to Noise Ratio</i> (Razão Sinal/Ruído)

<b>S<sub>N</sub>2</b>	Substituição Nucleofílica Bimolecular
<b>SPE</b>	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
<b>SQTF</b>	Serviço de Química e Toxicologia Forense
<b><i>t</i></b>	Tripleto
<b>TCD</b>	<i>Thermal Conductivity Detector</i> (Detector de Condutividade Térmica)
<b>THC</b>	Tetra-hidrocanabinol
<b>THCCOOH</b>	1-nor-9-carboxi-THC
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
<b>TLC</b>	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografia em Camada Fina)
<b>TMCS</b>	Trimetilclorosilano
<b>t<sub>R</sub></b>	Tempo de Retenção
<b>t<sub>Rr</sub></b>	Tempo de Retenção Relativo
<b>v</b>	Volume
<b>WADA</b>	<i>World Anti-Doping Agency</i> (Agência Mundial Antidopagem)
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
<b>WLSR</b>	<i>Weighted Least Squares Regression</i> (Mínimos Quadrados Ponderados)
<b><math>\bar{X}</math></b>	Valor Médio
<b><math>\alpha</math>-PVP</b>	( <i>RS</i> )-1-fenil-2-(1-pirrolidinil)-1-pentanona
<b><math>\delta_C</math></b>	Desvio Químico de Carbono
<b><math>\delta_H</math></b>	Desvio Químico de Protão
<b>°C</b>	Graus Celsius

## 1. Introdução Teórica

O consumo de drogas na Europa engloba atualmente um maior leque de substâncias do que no passado. Desde as décadas de 1970 e 1980 que existem grandes mercados para a canábis, a heroína e as anfetaminas em diversos países europeus. Porém, ao longo dos anos foram surgindo outras substâncias que vieram juntar-se às já existentes, tais como a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e a cocaína na década de 1990 e uma vasta gama de novas substâncias psicoativas (NSP), que começaram a aparecer na última década e que comprovam a evolução deste mercado [1].

O recente surgimento destas substâncias e os seus respetivos padrões de consumo têm graves implicações para a saúde pública, tendo-se verificado a comercialização de uma vasta gama de substâncias especialmente “desenhadas” de modo a escaparem à fiscalização de substâncias proibidas [2].

Desta forma, torna-se essencial a sua monitorização para que se possam aplicar os devidos padrões legais, pelo que entram em ação instâncias europeias como o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA) e o Serviço Europeu de Polícia (*European Union's Law Enforcement Agency*, EUROPOL), responsáveis pelo acompanhamento e regulação desta problemática, visando a redução da procura e da oferta destas substâncias e, consequentemente, a diminuição dos riscos associados ao seu tráfico e consumo [2].

### 1.1. Novas Substâncias Psicoativas

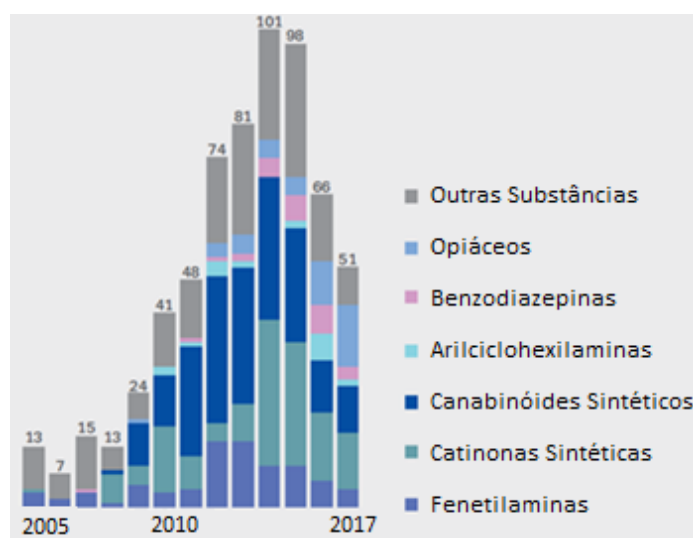
Segundo o EMCDDA, “consideram-se NSP novos estupefacientes ou substâncias psicotrópicas, na forma pura ou em preparação, que não são controladas pelas convenções das Nações Unidas referentes aos estupefacientes (1961) e psicotrópicos (1971), mas que podem representar um risco à saúde pública comparável ao representado pelas substâncias listadas nessas convenções” [3].

Este termo é atribuído não só a compostos que foram recentemente sintetizados, mas também a substâncias que já existiam, mas que apareceram recentemente no mercado ou só agora são usadas de forma imprópria (como a mefedrona, sintetizada pela primeira vez em 1929, tendo aparecido no mercado de drogas em meados de 2000) [2, 4, 5]. De uma forma geral, os compostos sintetizados são normalmente desenvolvidos para mimetizar os efeitos de substâncias naturais ou sintéticas que são controladas, para desta forma “fugir” às implicações legais a elas associadas. Deste modo, tem-se verificado que à medida que se adicionam novas substâncias psicoativas às listas de compostos controlados, são criadas variantes das mesmas que escapam a esse mesmo controlo [2].

Para além deste conceito, são usados outros termos para designar estas substâncias [2, 6]. Destes, salientam-se os termos *legal highs* (por serem alternativas legais a drogas já controladas), *herbal highs* (se disserem respeito a produtos naturais, provenientes de plantas), *research chemicals* (recorrendo aos seus próprios nomes químicos, como reagentes utilizados para investigação), *party pills* (drogas recreativas) ou *designer*

*drugs* (drogas laboratoriais ou de síntese) [2, 4]. Estes produtos são muitas vezes vendidos como substâncias “inócuas para a saúde”, mas geralmente contêm no rótulo indicações como “não adequado a consumo humano”, sendo comercializados sob a forma de sais de banho, incensos, comprimidos sem outra caracterização, ervas, fungos ou fertilizantes [4, 7, 8].

Estas substâncias podem ser categorizadas com base nas suas estruturas químicas (Figura 1.1) ou nos seus efeitos psicotrópicos [9], salientando-se os opiáceos, as benzodiazepinas, as arilciclohexilaminas, os canabinóides sintéticos, as catinonas sintéticas e as fenetilaminas [1, 6, 10, 11]. A distribuição e prevalência destes compostos varia ao longo do tempo e de acordo com o país em questão [10].



**Figura 1.1: Número e principais grupos de NSP notificadas pela primeira vez ao mecanismo de alerta rápido da União Europeia, de 2005 a 2017 [Adaptado de 11].**

Nos últimos anos tem sido notório o crescimento da comercialização e consumo destas NSP, que se deve em grande parte ao enorme desenvolvimento tecnológico, à capacidade de se sintetizar compostos orgânicos a baixo custo, à globalização comercial, à imensa disponibilidade de reagentes para a síntese destas drogas e à capacidade de se utilizar a internet para *marketing* e venda [4].

No final de 2017, o EMCDDA monitorizava mais de 670 NSP que surgiram no mercado de droga europeu. Quase 70% das NSP identificadas através do Mecanismo de Alerta Rápido da União Europeia (*Early Warning System*, EWS) foram detetadas nos últimos cinco anos, e só em 2017 foram detetadas pela primeira vez 51 novas substâncias na Europa [11].

Este número é inferior ao registado nos cinco anos anteriores [11], e esta redução pode ser devida às medidas adotadas pelos governos nacionais europeus para proibir estas substâncias (em especial a sua venda como substitutos “legais” de drogas ilícitas), bem como às medidas de controlo existentes na China, tendo em conta que estas substâncias são produzidas em quantidades a granel por empresas químicas e farmacêuticas

desse país. Em algumas partes da Europa, essas medidas de controlo que levaram ao desaparecimento de diversas lojas nos grandes centros urbanos parecem ter afetado o acesso a estas substâncias [1, 11].

Da China, as NSP são expedidas para a Europa, onde são transformadas em produtos, embaladas e vendidas. Podem também ser produzidas em laboratórios clandestinos na Europa ou noutros locais e, por outro lado, podem ter origem em medicamentos que são posteriormente desviados da cadeia de abastecimento legítima [1, 11].

A sua venda é especialmente difícil de controlar quando é feita à distância, através de encomendas e pagamentos efetuados por meios eletrónicos, sendo assim facilitada pelo aparecimento de novas tecnologias ligadas à internet, que existem em paralelo com o mercado físico de drogas, sendo o mais comum o das denominadas *smartshops*, que se dedicam à venda indiscriminada de NSP [1, 7]. Alguns vendedores utilizam a internet “de superfície”, normalmente para a venda de químicos precursores não controlados, de novas substâncias psicoativas ou de medicamentos, que podem ser falsificados ou contrafeitos. Outros trabalham com recurso à internet “oculta”, através de mercados privados, apoiados por tecnologias que ocultam as identidades do comprador e do vendedor [1, 11].

Tendo em conta o dinamismo deste fenómeno, a informação disponível sobre os efeitos e danos que estas substâncias podem causar aos consumidores é ainda limitada, pelo que é importante ter pelo menos uma ideia geral sobre os maiores riscos associados a estas substâncias [2].

#### **1.1.1. Riscos Associados ao Consumo de Novas Substâncias Psicoativas**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, WHO), o uso de substâncias psicoativas pode levar à síndrome da dependência, que se define como sendo um conjunto de fenómenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após o uso repetido de substâncias e que tipicamente incluem um forte desejo de consumir a droga, dificuldades em controlar o seu uso, uma prioridade maior dada ao uso de drogas do que a outras atividades e obrigações, maior tolerância à substância e, por vezes, um síndrome de abstinência física [12].

Ao contrário do que acontece com novos fármacos ou medicamentos, que são intensamente estudados em ensaios clínicos controlados no que diz respeito ao seu metabolismo e outros parâmetros farmacocinéticos, as NSP são colocadas no mercado sem que tenham sido estudados os seus parâmetros farmacológicos, farmacocinéticos e toxicológicos ou sem que haja informação analítica correspondente às mesmas [4, 7, 13].

Desta forma, às novas substâncias psicoativas estão associados riscos que se podem traduzir no perigo para a vida, para a saúde ou para a integridade física [7].

O seu consumo pode ser feito por ingestão, inalação, aspiração, aplicação sobre a pele ou quaisquer outras vias de absorção [7], e para além de causar dependência, o consumo destas substâncias pode provocar danos

permanentes nos seus consumidores, devido ao facto de atuarem essencialmente a nível do sistema nervoso central [7, 13, 14]. Ao transpor rapidamente o sistema nervoso central, dá-se uma indução do aumento da libertação de neurotransmissores excitatórios (como a dopamina, a noradrenalina e a serotonina) [15]. Assim, são comuns alterações degenerativas nas funções motoras ou na capacidade de raciocínio ou de juízo crítico nos indivíduos, o que se pode traduzir em casos de delírio, alucinações e euforia extrema [7]. Sendo potentes estimulantes, produzem também excitação, diminuição da fadiga, aumento de energia e aumento do tempo e estado de vigília [7, 13].

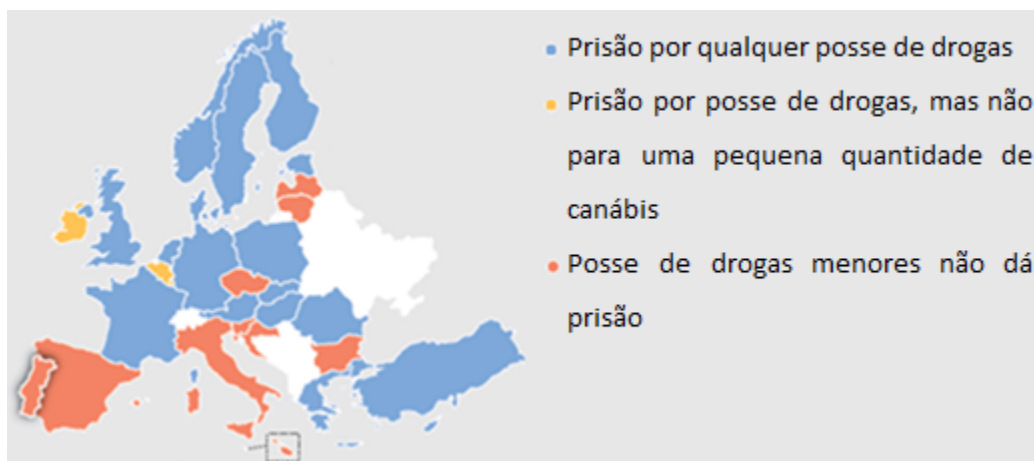
Para além disso, muitas vezes a rotulagem destas substâncias pode não corresponder ao seu conteúdo, tornando-as ainda mais perigosas para a saúde pública [16]. Por outro lado, é frequente que nas formulações apreendidas se encontre mais do que uma substância, o que dificulta o estudo individual da farmacodinâmica de cada uma e, no seu conjunto, torna maior a imprevisibilidade dos efeitos do produto [17, 18]. Estas substâncias são normalmente sintetizadas com recurso a reagentes baratos e de baixa pureza e o produto final não é submetido a qualquer tipo de controlo [13]. Salienta-se ainda que são numerosos os casos reportados destas substâncias estarem envolvidas em intoxicações fatais [8, 19].

Os danos associados às novas drogas trazem um novo conjunto de desafios às unidades de intervenção de primeira linha. O padrão individual de consumo pode ser experimental, habitual ou de dependência, e a utilização problemática destas substâncias está a tornar-se mais evidente em certos contextos e entre alguns estratos da população mais vulneráveis [1].

Assim, e tendo em conta as mortes associadas a estas substâncias, torna-se da maior importância controlar estes compostos, tópico que se irá abordar de seguida.

### **1.1.2. Legislação em Portugal e na Europa**

As sanções aplicáveis ao fornecimento de droga variam em função da droga e do país, como ilustra a Figura 1.2 [6, 10]. Estas variações podem ser resultado de fatores históricos e culturais que influenciam os sistemas de direito penal de um país, bem como das diferentes opiniões nacionais sobre a eficácia da condenação como medida dissuasora. A oferta não autorizada de droga é crime em todos os países europeus, mas as sanções consagradas na lei diferem significativamente, apesar da finalidade comum a toda a Europa de as proibir [1, 11].



**Figura 1.2: Possibilidade de prisão por posse de drogas para uso pessoal (delito menor) [Adaptado de 20].**

Desta forma, no final dos anos de 1990, foi criada pelo Conselho da Europa uma ação conjunta que visa resolver a problemática das NSP que não se enquadravam dentro das regras definidas pelas convenções internacionais sobre drogas. Foi também nesta altura que se criou o EWS, um sistema europeu que possibilita o intercâmbio rápido de informação sobre NSP entre os Estados Membros, prevê uma avaliação dos riscos associados ao seu consumo e permite que as medidas aplicáveis ao controlo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas sejam também aplicáveis a estas novas substâncias. Desta forma, este sistema assegura a recolha e análise de informação de uma forma rápida, relevante e fiável, sustentando a tomada de iniciativas para sujeitar as NSP a medidas de controlo [2].

Quanto à forma de atuação do sistema, esta tem por base três etapas essenciais. Em primeiro lugar, emite-se um alerta através de passagem de informação entre os diferentes países abrangidos por este sistema. De seguida, caso o tipo de alerta o permita, é efetuada uma avaliação de risco pelo EMCDDA e, por último, é tomada uma decisão política a nível europeu quanto à substância em causa, com base na informação e avaliação reunidas [2].

Quanto ao panorama em Portugal, deve começar-se por evidenciar que este sistema é representado pelo Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD). É importante referir o Decreto-Lei nº 15/93 de 22 de janeiro, que abrange todas as substâncias proibidas, razão pela qual é alterado aquando da atualização da lista de substâncias consideradas como drogas. O Decreto-Lei nº 54/2013 de 17 de abril constitui um novo controlo legislativo quanto às NSP, penalizando o uso e comercialização de um total de 159 substâncias, 33 das quais catinonas sintéticas [2, 8]. Além disso, seria ilegal a produção, importação, exportação, distribuição, publicidade, entrega ou posse destas substâncias, o que resultou no fecho de *smartshops* em todo o país. Esta nova lei prevê também a atualização progressiva da lista de substâncias controladas a cada 18 meses [8]. Mais recentemente, foi feita a vigésima segunda alteração ao Decreto-Lei nº 15/93 de 22 de janeiro, que constitui assim a Lei nº 7/2017 de 2 de março e adiciona à lista



de substâncias proibidas substâncias como a MDPV e a metilona que, desta forma, deixam de ser caracterizadas como NSP, passando assim a serem consideradas drogas ilícitas [2]. Esta decisão nasce da necessidade de sujeitar estas substâncias a medidas de controlo e sanções penais, reduzindo os riscos de abuso e utilização ilícita. Adicionam-se às substâncias referidas na lista os sais das substâncias indicadas (sempre que a sua existência seja possível), os respetivos isómeros que possam existir com designação química específica, exceto se forem expressamente excluídos [21], e todos os preparados em que as mesmas estejam associadas a outros compostos [7].

A nível nacional é também de evidenciar que, à semelhança do que acontece para as outras drogas, as penalizações referentes a posse para consumo de NSP por parte dos cidadãos tem tendência a não ser elevada. Aliás, a maioria da legislação referente a NSP penaliza as transações e não a posse de quantidades para consumo próprio, como indicado na Figura 1.2 [1].

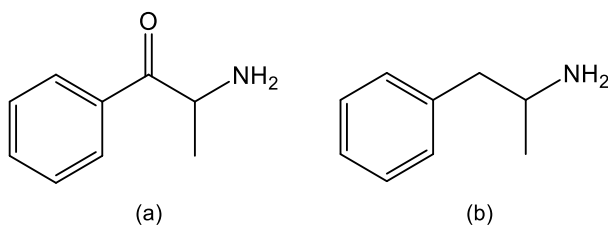
No entanto, a nível europeu e no que respeita à legislação inerente à União Europeia, o controlo destas substâncias está a ser revisto de forma a estabelecer um sistema transversal, rápido e eficaz para que situações que envolvam NSP sejam controladas pelo direito penal [1].

Tendo em conta as novas substâncias psicoativas presentes no mercado, é importante salientar os elevados volumes de apreensões da segunda maior categoria de novas substâncias psicoativas, que realça a importância do estudo das mesmas: as catinonas sintéticas.

### **1.1.3. Catinonas Sintéticas**

As catinonas sintéticas são compostos de estrutura semelhante à da catinona natural, o principal alcaloide psicoativo que ocorre na planta *Catha edulis forsk* (usualmente conhecida como *khat*), e cuja estrutura se encontra na Figura 1.3 [1, 6, 13]. Esta substância é conhecida pelas suas capacidades estimulantes e psicoativas, razão pela qual as catinonas sintéticas começaram a ser usadas como NSP, tendo em conta que a sua toxicidade em doses elevadas é semelhante à da cocaína, à das anfetaminas e à do MDMA [1, 8, 13]. Desta forma, e como seria de esperar, já foram relatadas intoxicações fatais por estas substâncias [9, 22].

É também de notar que a catinona natural é uma  $\beta$ -cetoanfetamina, razão pela qual as catinonas sintéticas são comumente denominadas por compostos (ou derivados) anfetamínicos, já que se assemelham às anfetaminas não só na sua estrutura química (Figura 1.3) como também no que respeita aos seus efeitos fisiológicos e comportamentais, embora as catinonas apresentem apenas cerca de metade da potência estimulante das anfetaminas [23].



**Figura 1.3: Estrutura da (a) catinona e da (b) anfetamina.**

O grupo cetona é responsável por aumentar a polaridade das catinonas em comparação com as anfetaminas, razão pela qual as catinonas têm mais dificuldade em passar a barreira hematoencefálica, o que se traduz numa diminuição da sua atividade [8, 13]. Por outro lado, a presença de um grupo pirrolidino na estrutura dos derivados da catinona (como na molécula de MDPV) reduz significativamente a sua polaridade, aumentando dessa forma o seu potencial impacto no sistema nervoso central [8, 13, 16].

Normalmente, os efeitos secundários dos derivados de catinonas são de natureza neurológica e cardiovascular, incluindo ansiedade, delírio, paranoia, taquicardia e hipertermia [24].

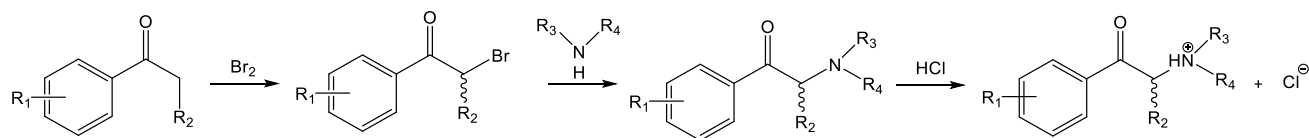
As catinonas sintéticas aparecem normalmente no mercado sob a forma de cloridratos e podem surgir em forma de pós brancos ou castanhos ou em comprimidos [19]. Podem ter variados “nomes de rua”, salientando-se Miaow Miaow, M-Cat, Msmack, Drone, Fert ou Bubbles [8, 25, 26].

As catinonas podem ser consumidas puras ou em conjunto com outras catinonas e/ou com diversos outros tipos de novas substâncias psicoativas, drogas ilícitas, medicamentos, agentes anestésicos e álcool [8].

A principal forma de administração destas substâncias é a ingestão, quer por deglutição das cápsulas quer por um método conhecido como *bomb wrapped*, em que o pó é ingerido após ser embrulhado em papel de cigarro. São também comuns as vias nasal (insuflação e inalação), mucosas gengival e sublingual, injeção intravenosa e administração retal [8].

É também de salientar que a concentração no sangue de diferentes catinonas varia consoante a substância e depende bastante da via de administração [27].

Os derivados de catinonas podem existir sob duas formas estereoisoméricas, mas a catinona natural ocorre na natureza como o enantiómero *S* [28]. Ambos os isómeros são ativos, mas o enantiómero que aparece naturalmente é cerca de três a cinco vezes mais potente que o enantiómero *R* [29]. No entanto, a racemização de todos os derivados da catinona pode ocorrer através de tautomerismo ceto-enólico, e embora existam processos estereoseletivos de produção de catinonas, as catinonas sintéticas dos mercados ilícitos são normalmente misturas racémicas, pois são produzidas em laboratórios clandestinos através de processos baratos e sem controlo de qualidade [30]. A Figura 1.4 descreve um processo de síntese de catinonas bastante simples, que promove a formação da mistura racémica no produto final.



**Figura 1.4: Exemplo de síntese de catinonas sintéticas.**

Os primeiros derivados de catinona foram originalmente sintetizados no início do século XX para fins terapêuticos [8], mas apareceram pela primeira vez no mercado de drogas europeu em meados de 2000 e constituem o segundo maior grupo de novas substâncias psicoativas monitorizadas pelo EMCDDA [19].

A sua grande disponibilidade, os seus baixos preços, a elevada pureza a que são vendidas e a sua popularidade na internet são alguns dos principais fatores que justificam os elevados níveis de consumo das catinonas [19]. No total, foram já detetadas 130 catinonas sintéticas, sendo que 12 destas foram detetadas pela primeira vez em 2017, uma redução face ao número de 14 apreensões em 2016 [11].

Para a rápida deteção e identificação destas NSP, é necessária a aplicação de métodos analíticos de identificação e caracterização essencialmente rápidos, sensíveis e rigorosos, tendo em conta que deles dependem decisões e sentenças judiciais que podem influenciar não só o indivíduo como a sociedade. Assim, antes de ser inserido na rotina laboratorial, o método analítico desenvolvido deve ser validado, sendo necessário demonstrar que este se adequa ao propósito a que se destina [31].

## **1.2. Métodos de Identificação e Análise de Catinonas**

Tendo em conta a variedade e evolução dos derivados da catinona, juntamente com a falta de dados analíticos disponíveis sobre estas substâncias e a falta de padrões de referência, a identificação destas novas substâncias psicoativas constitui um desafio analítico contínuo [32, 33].

Com efeito, o ritmo alarmante a que estas novas drogas são concebidas e introduzidas no mercado ilícito supera significativamente a capacidade dos laboratórios de medicina legal e forense para o desenvolvimento e validação de métodos de análise adequados [31]. Assim, tendo em conta o constante aparecimento de NSP no mercado, é essencial que os laboratórios de toxicologia forense tenham ao seu dispor técnicas de análise válidas e sensíveis à mais flutuante presença destas substâncias, uma vez que as técnicas mais comuns se revelam inapropriadas para detetar as concentrações, consideravelmente vestigiais, em que estas NSP se encontram nas diferentes matrizes biológicas [17].

Além disso, muitas destas novas drogas não podem ser detetadas segundo abordagens tradicionais de triagem, podendo requerer técnicas instrumentais mais especializadas e dispendiosas [31]. De uma forma geral, as NSP não são facilmente detetadas em imunoensaios, testes rápidos usados na triagem de drogas e que têm uma boa relação custo/benefício, uma vez que ainda não se encontram comercializados dispositivos adequados a estas substâncias. Além disso, no caso de um resultado positivo, a identificação da substância em causa (que pode reagir de forma cruzada com o imunoensaio) deve ser realizada por uma técnica de

cromatografia e/ou espectrometria de massa capaz de distinguir entre estruturas semelhantes e isómeros. É neste âmbito que se usam frequentemente técnicas hifenadas para solucionar este problema, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) ou a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (*gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS), que requerem uma etapa prévia de preparação antes da análise, especialmente tratando-se de matrizes altamente complexas, como o sangue. É desta forma necessário um pré-tratamento da amostra, de modo a torná-la mais fácil de analisar removendo os componentes indesejáveis da matriz, reduzindo assim o seu efeito e aumentando a sensibilidade [17]. Desta forma, e para uma maior perceção do trabalho em desenvolvimento, todos estes tópicos se encontram de seguida desenvolvidos.

### **1.2.1. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa**

Tendo em conta o uso da técnica de GC-MS como principal método de análise no desenvolvimento do trabalho em questão, segue uma breve introdução sobre esta técnica cromatográfica.

A GC-MS é uma técnica hifenada de análise qualitativa e quantitativa, já francamente estabelecida em laboratórios de toxicologia forense e clínica, e constitui um requisito para qualquer laboratório que realize análises toxicológicas [17].

A sua robustez, especificidade e baixo custo em relação a outras técnicas cromatográficas hifenadas constituem algumas das suas principais vantagens [31, 34], e é também de referir que a maioria dos componentes ativos das novas substâncias psicoativas pode ser caracterizada por esta técnica devido às suas propriedades voláteis [34, 35], o que realça a sua importância no trabalho em desenvolvimento.

Para a maioria dos detetores de GC, a identificação é baseada apenas no tempo de retenção, mas, uma vez que muitos compostos podem possuir o mesmo tempo de retenção, é importante a associação desta técnica com a possibilidade de obter espectros de massa. A combinação GC-MS é então uma ferramenta altamente eficaz na separação de misturas complexas, possibilitando a obtenção de dados qualitativos e quantitativos de cada composto [34, 36].

De uma forma geral, a técnica de cromatografia gasosa tem como base a introdução da amostra num injetor que se encontra ligado à coluna cromatográfica, sendo os componentes gasosos da amostra injetada transportados ao longo da fase estacionária por meio de um gás de arraste (que constitui a fase móvel), sendo assim separados de acordo com os seus pontos de ebulição e a sua afinidade para a coluna, frequentemente de natureza apolar [34, 37].

A injeção da amostra é realizada com recurso a uma microseringa capilar graduada que injeta a mistura numa câmara de vaporização de um modo bastante rápido. Após a vaporização, a mistura atravessa um *liner* inerte de vidro e é finalmente separada na coluna cromatográfica [34].

Os sistemas de injeção que usam colunas capilares atuam com ou sem repartição de fluxo (respetivamente, os modos *split* e *splitless*) [37]. Assim, a quantidade de amostra a analisar que é introduzida na coluna pode ser controlada, sendo que depende da concentração a que os compostos se apresentam na mistura em estudo. O modo *split* é indicado para casos em que o analito constitui mais de 0,1% da mistura, sendo que apenas uma pequena percentagem da amostra é analisada (cerca de 0,2 a 2,0% desta), sendo a restante excluída. Desta forma, é evitada a saturação da coluna, o que permite uma análise de alta resolução [38]. Já o modo *splitless* é indicado para quando o analito constitui menos de 0,01% da amostra. Todavia, sendo a totalidade da mistura analisada, pode ser mais difícil discernir uma separação mais eficaz, o que vai variar com a quantidade de compostos presentes e respetivas concentrações [38].

A fase estacionária corresponde geralmente a um líquido com alguma viscosidade que se encontra quimicamente ligado ao interior de um tubo capilar ou à superfície de pequenos sólidos empacotados na coluna (colunas capilares ou empacotadas, respetivamente). As colunas capilares apresentam uma eficiência de separação maior (ou seja, uma maior resolução) que as colunas empacotadas [37, 38]. São vários os critérios utilizados na escolha de uma fase estacionária: deve ter um ponto de ebulição mais elevado que a temperatura de operação da coluna, deve ser termicamente estável e não deve reagir quimicamente com a amostra em estudo [37]. A polaridade dos compostos é também um fator importante na escolha da fase estacionária, uma vez que se estes não revelarem afinidade para com a mesma, não irão sofrer retenção pela coluna e, desta forma, não se pode falar em separação, razão pela qual compostos polares requerem uma fase estacionária polar, e vice-versa. O composto apolar mais comum no fabrico de colunas é o polidimetilsiloxano, sendo que ao substituir os grupos metilo por substituintes mais polares, o carácter polar da fase estacionária vai aumentando [37].

Assim, a ordem de separação dos compostos numa mistura é afetada pela sua afinidade para com a fase estacionária. Porém, o critério que mais influencia a ordem de separação dos compostos é o ponto de ebulição, estando assim diretamente relacionado com a variação da temperatura ao longo do tempo de eluição [37].

No que diz respeito aos gases de arraste, é de referir que os mais usados são normalmente o hidrogénio, o hélio ou o azoto, e devem ser puros e quimicamente inertes. A escolha deste gás está condicionada a vários fatores, entre eles o custo, a segurança e a rapidez da análise, sendo o hélio o mais usado [34].

Também a escolha do processo de ionização varia com as características do composto em estudo, sendo que se deve também tomar em atenção a quantidade de energia interna que se vai transferir durante o processo. Duas das técnicas de ionização mais utilizadas são a ionização por impacto eletrónico (*electron ionization*, EI) e a ionização química (*chemical ionization*, CI). Na primeira faz-se interagir o analito vaporizado com um feixe de eletrões, enquanto que na segunda o analito, também vaporizado, reage com compostos químicos que vão promover a sua fragmentação, sendo que em ambos os casos o fragmento se caracteriza

por ser um íon positivo, como acontece sempre independentemente da técnica de ionização. A EI é bastante útil na identificação de compostos pois produz um elevado número de iões, contribuindo assim para uma elevada fragmentação e demonstrando com isto uma seletividade elevada. No entanto, a fragmentação em excesso pode revelar-se prejudicial fazendo com que seja complicado ou impossível identificar, por exemplo, o íon molecular, o que impede imediatamente uma correta aferição da massa molecular do analito [37]. A fragmentação de cada composto é característica do mesmo, sendo obtido um valor da razão massa/carga ( $m/z$ ) para cada um dos fragmentos. Assim, quer seja por comparação com bases de dados de espectros ou por dedução da própria estrutura inicial dos compostos (quando esta é conhecida antes da ionização), é possível uma identificação correta de cada um dos compostos [6, 37]. No que diz respeito às cationonas sintéticas, é de referir que em modo EI estas fragmentam de uma forma característica, como indicado na Figura 1.5, o que facilita a sua identificação [39].

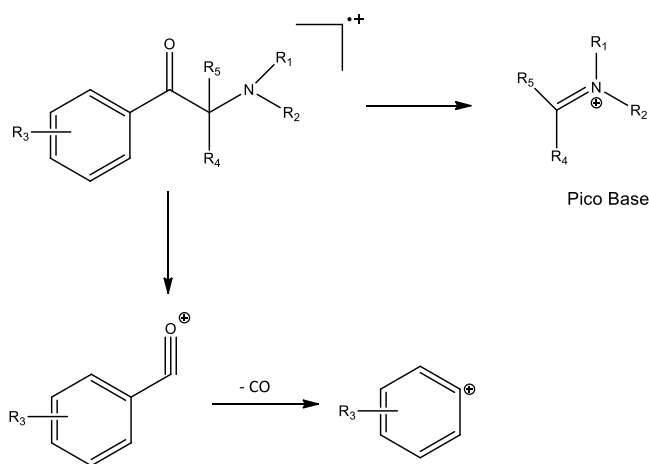


Figura 1.5: Esquema de fragmentações de uma cationona por EI [39].

Por outro lado, os detetores devem ser de fácil utilização e ter um tempo de resposta reduzido e independente do fluxo, além de que devem ser também reproduzíveis e capazes de originar uma resposta linear num amplo leque de valores de concentração. Deve referir-se que a sensibilidade é um critério importante na avaliação da qualidade dos detetores, pois quanto maior a sensibilidade maior a probabilidade de se conseguirem apurar limites de deteção baixos. Os detetores podem ser seletivos ou universais, sendo que os primeiros apresentam uma resposta seletiva a determinados compostos ou famílias de compostos, enquanto os segundos apresentam respostas para todo e qualquer composto. Assim, a sua escolha deve prender-se com o objetivo do estudo e com a tipologia em mente [37]. Os detetores universais mais usados são o detetor de ionização de chama (*flame ionization detector*, FID) e o detetor de condutividade térmica (*thermal conductivity detector*, TCD). Já os detetores de captura eletrónica (*electron capture detector*, ECD) e os detetores de azoto e fósforo (*nitrogen-phosphorus detector*, NPD) dizem respeito aos detetores seletivos

mais utilizados, sendo que os primeiros são adequados a analitos que tenham afinidade eletrônica (como por exemplo compostos halogenados), enquanto os segundos são direcionados a compostos com azoto e fósforo. Assim, cada caso pode exigir o uso de um detetor diferente e, como tal, esta torna-se uma peça fundamental do uso desta técnica [37].

Considerando as baixas concentrações em que as substâncias em estudo se encontram presentes nas amostras biológicas, no desenvolvimento deste trabalho optou-se pela utilização de um detetor de espectrometria de massa, uma vez que possui maior sensibilidade que os detetores universais.

Por fim, falta referir que existem diversos analisadores de massa, responsáveis pela separação dos fragmentos nos valores de razão  $m/z$ , sendo que o mais utilizado e comum neste tipo de separação e identificação é o quadrupolo [37, 40]. Neste, a análise pode ser feita em modo *full scan*, analisando todos os iões num intervalo de  $m/z$  definido (o espectro de massa completo de cada composto), ou em modo de monitorização seletiva de iões (*selective ion monitoring*, SIM). É importante salientar que em modo SIM, apesar de não se obter um espectro que revele todos os iões da amostra, a sensibilidade é mais elevada, uma vez que só se procuram assinaturas de iões específicas, sendo que desta forma é possível que se apontem para limites de deteção mais baixos, uma vez que o detetor apenas “procura” fragmentos específicos, podendo gastar mais tempo na análise de cada um deles [37, 41, 42].

Podem ser variadas as matrizes biológicas analisadas por GC-MS para identificação e quantificação de catinonas sintéticas, tópico que se discutirá de seguida.

### **1.2.2. Amostras Biológicas**

É importante reter que os resultados são tão adequados quanto a qualidade e tipo da amostra em análise [43]. Esta amostra deve ser extraída do local mais apto para a análise toxicológica pretendida e ser comparada com uma amostra branca (uma amostra com a mesma matriz, mas que não contenha a substância em estudo) [44].

A preservação das amostras biológicas para exames e análises futuras é um dos aspetos mais importantes a ter em conta ao lidar com este tipo de amostras. Durante o tempo decorrido entre a recolha e a análise, as amostras tendem a degradar-se, razão pela qual é imperativo ter um processo de armazenamento eficiente (tanto a curto como a longo prazo) e que preserve a integridade das mesmas [45].

Para uma correta preservação das amostras é necessário que se reduza ao máximo a contaminação destas por processos físicos, químicos ou biológicos, sendo de salientar alguns que acontecem após a morte do organismo dador e que podem afetar os níveis de concentração de qualquer tipo de substâncias no sangue (medicamentos, drogas ou outros) [46, 47]. São exemplos alguns processos enzimáticos (em que enzimas libertam estes compostos das matrizes celulares), processos bacterianos (as bactérias utilizam estas

substâncias como substratos), ou ainda a simples redistribuição destes compostos pelo organismo em função do tempo [47].

A quantidade ou tamanho da amostra não precisam de ser muito grandes. No entanto, existe um elevado risco de se obterem resultados sem leitura científica no caso de se utilizar uma porção da amostra que não seja representativa [44, 48].

Já a escolha da amostra depende diretamente do caso em estudo [46]. Graças à sua fácil obtenção e manipulação, tanto a urina como o sangue, quer seja periférico ou cardíaco (sendo que o melhor para análise quantitativa é o periférico), são muito comuns em análises toxicológicas *post mortem* [44, 48, 49]. Ainda em amostras deste carácter, também são comuns análises a humor vítreo, cabelo, fígado ou conteúdo gástrico [46, 48]. No que diz respeito ao trabalho em desenvolvimento, foram escolhidos o sangue e a urina tendo em conta a sua fácil manipulação e o facto de serem as amostras biológicas mais frequentemente colhidas quando há suspeita de consumo de catinonas. Por outro lado, a análise de sangue permite estabelecer uma correlação entre as concentrações determinadas e os seus efeitos tóxicos.

É também de referir a necessidade de se seguirem uma série de passos importantes desde a recolha à análise das amostras; estas devem, em primeiro lugar, ser recolhidas sem contaminações, ser propriamente seladas, e a sua preservação e o seu transporte devem ser eficazes [48, 50]. Salienta-se ainda a extrema necessidade de se manter todo este processo inviolável durante a análise de casos forenses, respeitando a cadeia de custódia e garantindo assim uma análise objetiva e verdadeira destes casos [50].

Antes da injeção num equipamento de GC-MS, as amostras devem sofrer uma etapa prévia de preparação que pode ser realizada através de vários processos, sendo o método em estudo nesta dissertação a extração em fase sólida (*solid phase extraction*, SPE).

### **1.2.3. Extração em Fase Sólida**

Uma das etapas mais importantes num processo analítico é a preparação das amostras biológicas, considerada um passo limitante de todo o processo tendo em conta que ocupa a maior parte do tempo da análise. É nesta etapa que se dá a redução do volume da amostra, a extração e concentração dos analitos, a limpeza da amostra ou ainda a derivatização química, e a eficácia deste processo permite a obtenção de menores limites de deteção [51]. A limpeza da matriz a analisar impede que os interferentes da mesma possam interferir com a análise dos analitos, promovendo a obtenção de cromatogramas mais limpos [52]. Este processo aumenta também o tempo de vida do equipamento analítico em uso, tendo em conta que amostras mais limpas causam menos danos aos aparelhos [53].

A escolha do método de preparação da amostra depende principalmente da matriz biológica em causa, das propriedades da mistura a analisar e do problema analítico em questão [54]. Destes, destacam-se a extração

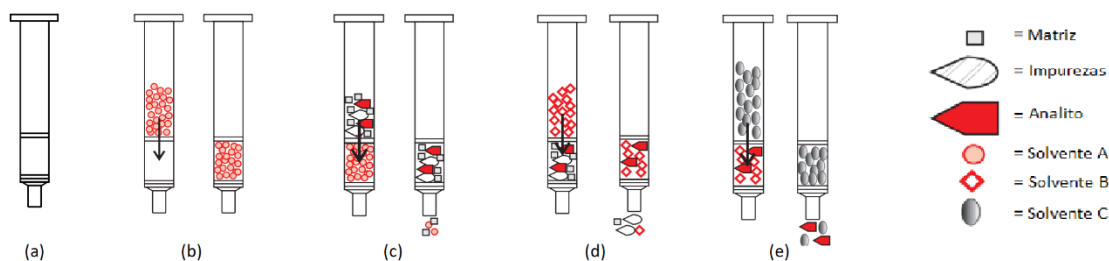


líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE), a centrifugação, a filtração, a precipitação e a extração em fase sólida [51, 53].

A SPE tem como principal objetivo a extração e concentração do analito da solução em que se encontra, promovendo a eliminação dos interferentes da matriz (como substâncias proteicas, sais, ureia, etc.), e concentrando o analito num pequeno volume de solvente adequado à análise cromatográfica [51]. É uma técnica de fácil e rápida execução e permite obter seletividade, exatidão e precisão, não ocorrendo formação de emulsões. Por outro lado, permite também a obtenção de elevados níveis de recuperação de analito e produz extratos limpos [55]. Tendo em conta que recorre a um baixo consumo de solventes orgânicos, que permite a troca entre solventes orgânicos e aquosos e que utiliza baixos volumes de amostra, é também uma técnica de relativo baixo custo. Além disso, é um processo específico, uma vez que é possível utilizar vários mecanismos de interação do analito com a fase sólida. Normalmente, a SPE é usada simultaneamente com outros tratamentos, tais como a diluição ou o ajuste do pH da amostra a analisar [56]. Tendo em conta as características desta técnica, foi escolhida a SPE para a preparação das amostras biológicas na dissertação em estudo.

O primeiro passo deste processo é a escolha da fase sólida a usar, o que neste caso se traduz no tipo de coluna (Figura 1.6 a) [55]. De seguida, dá-se o acondicionamento da coluna (Figura 1.6 b), para que o material adsorvente da mesma possa ser embebido por um solvente que promova a solvatação dos seus grupos funcionais [57, 58]; o solvente mais comumente usado nesta fase é o metanol [57]. De seguida dá-se a adição de água ou de um tampão aquoso, de modo a ativar a coluna, para que o mecanismo de adsorção funcione para amostras aquosas. Como terceiro passo, faz-se passar a solução a analisar, sendo que o analito se distribuirá entre a amostra no estado líquido e a fase sólida, atingindo-se um equilíbrio (Figura 1.6 c). Como resultado das interações fortes que se estabelecem, o analito é retido na fase sólida, ficando assim isolado da matriz. De seguida dá-se a lavagem da fase estacionária, o que vai limpar os interferentes da amostra (Figura 1.6 d) [55]. Em amostras aquosas, pode ser usado um tampão aquoso ou uma mistura de água e solvente orgânico. Se a amostra se encontrar dissolvida num solvente orgânico, o solvente de lavagem poderá ser esse mesmo solvente [59].

Por fim, segue-se a eluição, em que se dá a dessorção do analito, pelo que este vai ser seletivamente removido da fase sólida e posteriormente recolhido (Figura 1.6 e). Usa-se assim um eluente que possa quebrar a interação do analito com o adsorvente. O extrato obtido irá conter os analitos em estudo e, de seguida, poderá ser diretamente analisado por cromatografia ou poderá ser evaporado e reconstituído com um solvente mais adequado [55].



**Figura 1.6: Cinco etapas do processo de extração em fase sólida [Adaptado de 55].**

Como referido, o primeiro passo desta técnica reside na escolha da fase estacionária. Os adsorventes usados são semelhantes aos da cromatografia líquida, sendo que consistem normalmente em sílica-gel de 40  $\mu\text{m}$  com poros de aproximadamente 60 Å de diâmetro [51, 59]. O tipo de enchimento da coluna deve ser escolhido de acordo com os mecanismos de retenção que se pretendem, e pode ser classificado como fase normal, fase reversa, troca iónica ou exclusão molecular [51, 52].

Em fase normal, os enchimentos possuem grupos funcionais polares, sendo a fase estacionária mais polar que a matriz onde se encontra o analito. Desta forma, as forças que aqui são de enunciar são as ligações de hidrogénio, as interações dipolo-dipolo e as interações dipolo-dipolo induzido. Este tipo de adsorção pode, assim, ser fraca ou moderadamente forte [60]. A sílica é o tipo de enchimento mais usado nesta fase, sendo os seus grupos silanol responsáveis pelo estabelecimento de ligações de hidrogénio entre esta e o analito [61]. Quanto à eluição, esta é facilitada pelo uso de solventes polares, eficientes na quebra das ligações de hidrogénio entre o analito e a superfície do adsorvente. O metanol é bastante usado nesta fase tendo em conta que forma fortes ligações de hidrogénio com os grupos silanol da sílica, deslocando o analito [59, 60, 61].

Em fase reversa, os enchimentos detêm grupos funcionais apolares. Assim, há uma partição dos analitos orgânicos entre uma fase móvel polar (como a água) e uma fase sólida não polar [55, 59]. A partição consiste na interação do analito com as cadeias da fase estacionária (que podem ser hidrocarbonetos ou materiais poliméricos) e envolve as forças de van der Waals (ou de dispersão) podendo ocorrer também ligações de hidrogénio e interações dipolo-dipolo [55, 59]. A partição é regulada entre o potencial químico do analito nas duas fases, pelo que a sua polaridade tem um importante papel na estimativa da eficiência da fase sólida no isolamento do analito [59]. Na fase reversa, a eluição dos analitos consiste na escolha de um solvente polar para quebrar as forças de van der Waals que os retêm [51, 59]. Sendo a adsorção um processo de partição, o solvente tem de ter contacto com a fase ligada para eluir os analitos [51, 59]. O metanol, o acetonitrilo e o acetato de etilo são três possíveis solventes a usar nesta fase, pois podem estabelecer ligações de hidrogénio com os grupos silanol livres da superfície da sílica, têm alguma capacidade de dissolução em água e quebram facilmente as interações de van der Waals referidas [51, 59, 60].

No que diz respeito à troca iônica, o enchimento pode conter grupos funcionais aniônicos ou catiónicos [55, 59]. Os adsorventes de troca iônica isolam o analito com base no estado iônico da molécula, havendo troca do analito carregado com outra espécie carregada já adsorvida na resina. Neste modo, é necessário que o adsorvente esteja carregado com uma carga oposta à do analito, sendo usados grupos funcionais hidrofílicos. As forças que atuam na retenção são interações iônicas altamente energéticas, razão pela qual analitos polares podem ser removidos de solventes polares, principalmente a valores de pH próximos dos respectivos pKa [61]. Os adsorventes contêm grupos funcionais iônicos ligados à sílica, que podem ser fortes (sempre carregados independentemente do pH) ou fracos. No primeiro caso, para deslocar um ião é necessário que outro tome o seu lugar. Ao escolher este método deve considerar-se a estrutura e pKa do analito, de forma a averiguar se este pode ser ionizado positiva ou negativamente a certo pH. Deve também avaliar-se o peso molecular e o tamanho do analito, pois estes fatores influenciam o movimento da molécula através dos poros da resina trocadora. Deve também verificar-se se existem outros compostos carregados que possam interferir com a reação de troca iônica. Quanto à eluição, e no caso de um trocador catiónico, os cátions podem ser deslocados com um ácido forte ou por troca de um cátion que seja mais fortemente retido. Se o trocador for aniônico, os aniões podem ser deslocados com uma base forte ou substituídos por outros aniões [59, 61].

Por outro lado, a exclusão molecular é o melhor mecanismo de separação, tendo em conta que se baseia nas dimensões do analito e dos poros da fase estacionária [59].

É também importante mencionar a existência de adsorventes que combinam vários tipos de interação, o que aumenta a capacidade da técnica de separar o analito dos interferentes da amostra. Desta forma, a sua seletividade será tanto maior quanto maior for o número de interações entre o analito e a fase sólida. Esta técnica é chamada de SPE em modo misto, e envolve normalmente a fase reversa e a troca iônica. Desta forma, vários solventes diferentes podem ser usados para remover as interferências, mas o analito estará sempre retido por um ou por ambos os mecanismos [62]. Assim, os interferentes poderão ser retidos por um dos mecanismos, mas apenas o analito será retido pelo segundo mecanismo, pelo que aqueles podem ser facilmente eliminados. Uma das principais aplicações deste tipo de SPE é o isolamento de drogas e metabolitos a partir de amostras de urina e sangue [59], daí a sua importância neste estudo.

No entanto, qualquer método analítico é suscetível de apresentar erros sistemáticos e/ou aleatórios que podem conduzir a diferentes resultados analíticos [63]. Desta forma, antes de ser inserido na rotina laboratorial, todo e qualquer método analítico deve ser validado, de modo a demonstrar que conduz a resultados credíveis e consistentes [64, 65].

#### 1.2.4. Validação de Métodos Analíticos

Esta validação consiste num conjunto de procedimentos sistemáticos bem delineados que visam estabelecer os níveis de desempenho de um método, bem como as limitações do mesmo e os parâmetros que o podem condicionar [63]. Assim, todos os passos do método a validar devem ser tidos em consideração, salientando-se a amostragem, a preparação da amostra, a separação cromatográfica, a deteção dos analitos e a análise dos resultados [66]. Os resultados da validação avaliam desta forma a qualidade, a confiança e a consistência dos resultados analíticos [63].

Não há unanimidade quanto à forma correta de se validar um método, sendo que diferentes organizações defendem guias de validação ligeiramente diferentes [63, 65]. Há, contudo, algum consenso quanto aos principais parâmetros a avaliar aquando da validação de um método analítico qualitativo e/ou quantitativo, como se encontra resumido na Tabela 1.1 [36, 66].

**Tabela 1.1: Parâmetros de validação necessários para a validação de um método analítico qualitativo e quantitativo [66].**

Parâmetros a Estudar	Métodos Qualitativos	Métodos Quantitativos
Seletividade	×	×
Linearidade e Modelo de Calibração		×
Estabilidade		×
Precisão		×
Exatidão		×
Limites de Deteção	×	×
Limites de Quantificação		×
Recuperação	×	×
Robustez	×	×

A seletividade designa a capacidade de um método analítico para identificar, diferenciar e quantificar o analito em estudo inequivocamente, independentemente dos vários interferentes que a amostra possa possuir. Um método seletivo responde a diversas substâncias em simultâneo, mas consegue distinguir a resposta de uma substância de todas as outras respostas [51, 63, 64, 65].

A linearidade diz respeito à construção de uma reta de calibração que irá estudar a resposta analítica (variável dependente), que será diretamente proporcional à concentração do analito (variável independente), numa determinada gama de concentrações. São geralmente recomendados em geral cinco a oito calibradores para o estudo das funções lineares, embora alguns autores considerem que é estatisticamente mais vantajoso usar um menor número de níveis de calibração, mas com mais replicados, de modo a facilitar a deteção de pontos anómalos ou a necessidade de utilizar fatores de ponderação. As concentrações dos calibradores devem incluir toda a gama de calibração, sendo uniformemente distribuídas ao longo desta [51, 63, 64, 65]. Para verificar que um dado composto é estável a diversos tipos de ambientes ou temperaturas é feito um estudo da estabilidade, em que se deixam as amostras em diferentes condições de modo a entender quais as mais propícias à estabilidade da amostra [64, 65] e, consequentemente, das substâncias presentes.

Quanto à precisão, esta avalia a dispersão dos resultados analíticos obtidos em ensaios independentes (repetidos sobre uma mesma amostra, em amostras semelhantes ou padrões e em condições definidas) em torno do valor médio [64, 65]. É, assim, a medida do erro aleatório, e é determinada pelo desvio padrão relativo, variância ou coeficiente de variação (CV). Pode ser avaliada por três medidas: a repetibilidade, a reprodutibilidade e a precisão intermédia (SI) [63, 64, 65]. A repetibilidade diz respeito ao grau de dispersão de um método realizado em condições idênticas, sem variar nenhum fator que possa afetar a análise [64, 65]. As análises são, assim, realizadas num curto intervalo de tempo, normalmente no mesmo dia [51, 63, 64, 65, 66]. A reprodutibilidade designa o grau de concordância dos resultados obtidos para medições realizadas numa mesma amostra e pelo mesmo método em condições diferentes, normalmente em dias diferentes ou, como defendido por alguns autores [51, 63, 64, 65, 66], envolvendo vários laboratórios. A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada numa mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas com a variação de uma ou mais condições de análise [64, 65]. Pode assim ser realizada em dias diferentes e é a medida de precisão mais representativa da variabilidade dos resultados, sendo a mais aconselhada a realizar [51, 63, 64, 65, 66].

A exatidão do método é determinada pela concordância entre a melhor estimativa dos resultados individuais do ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro. A sua estimativa pode ser feita com recurso a ensaios com materiais de referência certificados, participação em ensaios interlaboratoriais, testes comparativos entre o método analítico desenvolvido e um método de referência ou um método normalizado e mediante amostras fortificadas [51, 63, 64, 65, 66].

A gama de trabalho diz respeito a um intervalo de concentrações mínima e máxima que são esperadas para determinado analito, de forma a evitar extrapolações. O limite de deteção (*limit of detection*, LOD) refere-se à menor concentração do analito que o método analítico consegue diferenciar do ruído, isto é, a menor quantidade de analito presente numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada [64]. Quanto ao limite de quantificação (*limit of quantification*, LOQ), este diz respeito, como o nome indica, à menor concentração de analito que o método consegue quantificar com adequada precisão e exatidão [51, 63, 64, 65, 66].

Entende-se como recuperação de um método analítico a resposta do detetor a uma quantidade de analito adicionada e extraída da matriz, comparada à resposta do detetor obtida da concentração real do analito (sem extração). Pode assim dizer-se que a recuperação corresponde à eficiência da extração do método analítico [64, 65, 66].

A robustez designa a capacidade de um método analítico para suportar pequenas variações sem que os resultados sejam afetados. Uma validação completa não necessita imperativamente de incluir a avaliação deste parâmetro, mas este é importante tendo em conta que permite a deteção de pequenos problemas que possam ocorrer durante e após a sua validação [51, 63, 64, 65, 66].

O processo de validação deve incluir o protocolo escrito (incluindo a definição do sistema a validar), a descrição do procedimento experimental, a identificação dos parâmetros de validação e a definição dos critérios de aceitação. Devem também ser realizados relatórios onde constem os resultados dos ensaios e as conclusões da validação. Caso os resultados destes ensaios não preencham os requisitos de aceitação, poderá ser necessário alterar o procedimento e, conseqüentemente, realizar um novo estudo de validação [64, 65]. É ainda de referir que todo e qualquer método analítico deve também ser revalidado sempre que as condições para as quais o método foi validado mudarem (tal como o uso de um instrumento ou de uma matriz diferentes). É também necessário proceder a uma revalidação no caso de se estender ou modificar métodos normalizados, de se usar métodos normalizados fora do âmbito de utilização previsto, no uso de métodos não normalizados ou de métodos criados e desenvolvidos pelo próprio laboratório [64, 65].

Para o trabalho em causa procedeu-se ao processo de validação de acordo com as normas da instituição em que o processo foi realizado. Foi também importante ter em conta os métodos validados para as catinonas em estudo que se encontraram na literatura, como se abordará de seguida.

### **1.3. Revisão Bibliográfica**

Depois de uma pesquisa geral sobre algumas catinonas em destaque neste momento no mercado, foram escolhidas como tema de trabalho a metilona, a MDPV, a  $\alpha$ -PVP, a 4-CEC e a 4-Cl-PVP, cujas estruturas e informações gerais se encontram nas Tabelas 1.2 a 1.6.

Para seleccionar as catinonas a estudar, foi tida em conta a sua deteção em Portugal, a sua relevância no que diz respeito às mortes a que estão associadas, bem como a escassez de métodos analíticos validados para a sua identificação em matrizes biológicas. A metilona e a MDPV foram escolhidas tendo em conta que passaram recentemente a ser substâncias controladas pelas convenções internacionais; a  $\alpha$ -PVP apresenta elevada relevância tendo em conta a quantidade de mortes que estão associadas ao consumo desta catinona; a 4-CEC e a 4-Cl-PVP apareceram recentemente no mercado de drogas português, razão pela qual é relevante a validação de métodos analíticos que possam ser inseridos na rotina para a sua rápida monitorização.

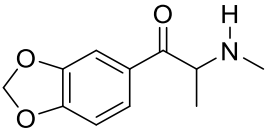
Existe uma certa discrepância no que diz respeito à quantidade de bibliografia encontrada para as cinco catinonas em causa. Enquanto que a MDPV apareceu no mercado em 2008, já é considerada uma droga ilícita e é das catinonas mais comuns, a deteção da 4-Cl-PVP é bastante recente, razão pela qual ainda não é possível encontrar-se informação sobre a mesma na literatura. O presente capítulo visa, assim, destacar os métodos de análise qualitativa e quantitativa já validados para as catinonas em estudo, bem como explicitar o tipo de amostra e alguns parâmetros das metodologias já validadas, informações resumidas na Tabela 1.7. A metilona foi relatada pela primeira vez em 2005 [32], pelo que é possível encontrar estudos publicados sobre o seu metabolismo e toxicidade [67]. Quando ingerida com outros fármacos e/ou álcool, pode induzir

um efeito aditivo ou sinérgico, razão pela qual é comercializada como “droga do amor“, tendo já sido detetada em crimes de abuso sexual [68].

É de realçar que a metilona já se encontra abrangida pela vigésima segunda alteração ao Decreto-Lei nº 15/93 de 22 de janeiro (Lei nº 7/2017 de 2 de março), razão pela qual já não é considerada NSP, mas sim uma droga ilícita [21]. Desta forma, é de vital importância a validação de métodos rápidos e eficazes para a sua deteção em matrizes biológicas, assumindo esta dissertação relevância neste campo.

Na literatura, é possível encontrar-se métodos validados tanto em sangue [17, 27, 31] como em urina [9, 17, 22, 25, 31, 68] para a identificação da molécula de metilona, através de métodos cromatográficos como GC-MS [17, 22, 25, 68], LC-Q/TOF (*liquid chromatography-quadrupole/time of flight*) [31], LC-HRMS (*liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*) [9] e LC-MS [27]. As técnicas de extração que se encontram na literatura são a SPE [9, 22, 25, 31], a microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) [17] e a LLE [68]. Encontra-se relatado o uso de mefedrona-*d*<sub>3</sub> [17, 27], anfetamina-*d*<sub>11</sub> [22], MDA-*d*<sub>5</sub> [22], butilona-*d*<sub>3</sub> [22], JWH-210-*d*<sub>9</sub> [27] ou metilona deuterada [9, 31, 68] como padrões internos e, como reagentes de derivatização, o cloroformato de hexilo [17], o PFPA [22] e o HFBA [68].

**Tabela 1.2: Informações gerais sobre a metilona.**

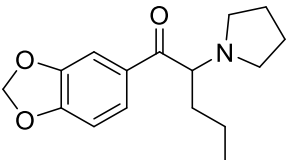
Estrutura	Informações Gerais
	<b>Nomes Comuns:</b> Metilona; 3,4-metilenedioxi- <i>N</i> -metilcatinona; MDMC; M1
	<b>Nome IUPAC:</b> ( <i>RS</i> )-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-(metilamino)-1-propanona
	<b>Fórmula Molecular:</b> C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>
	<b>Massa Molar:</b> 207,226 g/mol
	<b>Número CAS:</b> 186028-79-5
	<b>Designação:</b> Droga Ilícita
	<b>Primeiro Aparecimento no Mercado:</b> 2005
	<b>Abrangência Legal:</b> Lei nº 7/2017

A MDPV foi desenvolvida pela primeira vez pela Boehringer Ingelheim em 1969 para o tratamento da fadiga crónica e como supressor de apetite [6]. Foi detetada pela primeira vez no Japão em 2006, seguida da Alemanha em 2007 e da Finlândia, do Reino Unido e da Polónia em 2008 [6], sendo este último o ano da primeira notificação através do EWS [69, 70]. Entre setembro de 2009 e agosto de 2013 registaram-se em oito Estados Membros e na Noruega 108 ocorrências mortais [69]. A MDPV, a metilona e a mefedrona constituem atualmente 98% do mercado de catinonas sintéticas [8, 22]. À semelhança da metilona, é possível encontrar estudos sobre a toxicidade deste composto [6, 67].

A MDPV é um derivado estreitamente relacionado da  $\alpha$ -PVP, e foi também recentemente adicionada à Lista II da Convenção das Nações Unidas sobre Substâncias Psicotrópicas (1971) [71]. Assim, à semelhança da metilona, encontra-se abrangida pela Lei nº 7/2017 de 2 de março, sendo agora considerada uma droga ilícita [21].

É de evidenciar que se encontram métodos validados tanto em sangue [17, 24, 27, 31] como em urina [9, 17, 22, 24, 31], por métodos cromatográficos como GC-MS [17, 22, 24], LC-Q/TOF [31], LC-HRMS [9] e LC-MS [28] para a identificação de MDPV. Técnicas de extração como SPE [9, 22, 24, 31] e DLLME [17] já se encontram estudadas. Como padrão interno (*internal standard*, IS) já foi relatado o uso de mefedrona- $d_3$  [17, 27], anfetamina- $d_{11}$  [22], MDA- $d_5$  [22], butilona- $d_3$  [22], JWH-210- $d_9$  [27], metaqualona, diazepam- $d_5$ , metanfetamina- $d_5$  [24] ou MDPV deuterada [9, 31]. Os reagentes de derivatização encontrados na literatura são o cloroformato de hexilo [17] e o PFPA [22].

**Tabela 1.3: Informações gerais sobre a MDPV.**

Estrutura	Informações Gerais
	<b>Nomes Comuns:</b> MDPV; metilenodioxipirovalerona; MDPK, Cloud 9
	<b>Nome IUPAC:</b> (RS)-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-pirrolidinil-1-pentanona
	<b>Fórmula Molecular:</b> C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>
	<b>Massa Molar:</b> 275,348 g/mol
	<b>Número CAS:</b> 687603-66-3
	<b>Designação:</b> Droga Ilícita
	<b>Primeiro Aparecimento no Mercado:</b> 2008
	<b>Abrangência Legal:</b> Lei nº 7/2017

A  $\alpha$ -PVP foi desenvolvida pela primeira vez em 1963 pela Boehringer Ingelheim como um estimulante do sistema nervoso central, mas reapareceu no mercado das novas substâncias psicoativas há alguns anos [6, 18]. As primeiras apreensões relatadas desta substância ocorreram em 2011 na Europa e nos EUA, sendo que nos anos seguintes foi detetada em muitos produtos comercializados para a síntese de novas substâncias psicoativas e rapidamente se tornou popular em muitos países [18, 71].

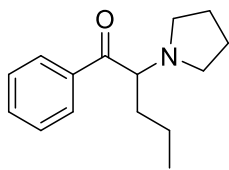
Em Portugal, a  $\alpha$ -PVP encontra-se listada na Portaria nº 154/2013 de 17 de abril, mas ainda é considerada uma nova substância psicoativa [7]. Este composto não é recente no mercado, pelo que já é possível encontrar diversos estudos sobre o mesmo [71], tal como a sua farmacodinâmica [6, 15, 18, 72]. Foram já registadas várias mortes associadas ao consumo desta substância, o que a destaca entre as restantes e constitui uma das principais razões da importância do seu estudo [71, 72].

Embora as catinonas sintéticas sejam conhecidas por serem compostos semelhantes à anfetamina, a  $\alpha$ -PVP e a MDPV atuam mais especificamente como compostos semelhantes à cocaína [6, 16].

Encontram-se métodos validados para a identificação da  $\alpha$ -PVP tanto em sangue [17, 18, 31] como em urina [9, 17, 22, 31], através de métodos cromatográficos como GC-MS [17, 22], LC-Q/TOF [31], LC-HRMS [9] e LC-MS [18]. Foram estudadas técnicas de extração como SPE [9, 22, 31] e DLLME [17]. Os padrões internos usados foram mefedrona- $d_3$  [17, 18], anfetamina- $d_{11}$  [22], MDA- $d_5$  [22], butilona- $d_3$  [22] ou o seu equivalente deuterado [9, 31] e os reagentes de derivatização relatados são o cloroformato de hexilo [17] e o PFPA [22].

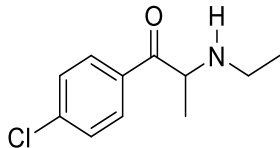


**Tabela 1.4: Informações gerais sobre o  $\alpha$ -PVP.**

Estrutura	Informações Gerais
	<b>Nomes Comuns:</b> $\alpha$ -PVP; $\alpha$ -pirrolidinovalerofenona; Flakka
	<b>Nome IUPAC:</b> (RS)-1-fenil-2-(1-pirrolidinil)-1-pentanona
	<b>Fórmula Molecular:</b> C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO
	<b>Massa Molar:</b> 231,339 g/mol
	<b>Número CAS:</b> 14530-33-7
	<b>Designação:</b> NSP
	<b>Primeiro Aparecimento no Mercado:</b> 2011
	<b>Abrangência Legal:</b> Decreto-Lei nº 54/2013

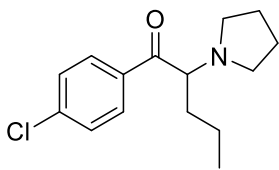
A 4-CEC apareceu pela primeira vez no mercado de drogas ilícitas europeu na Suécia em janeiro de 2016 [73]. O único estudo sobre a toxicidade e os padrões de uso desta catinona data de 2017 [23]. O recente aparecimento da molécula de 4-CEC no mercado justifica a escassez de métodos analíticos validados para a sua determinação qualitativa e quantitativa em amostras biológicas, pelo que esta dissertação é inovadora no que toca a este aspeto. As primeiras e únicas publicações científicas sobre este composto datam de 2017 [19, 23].

**Tabela 1.5: Informações gerais sobre a 4-CEC.**

Estrutura	Informações Gerais
	<b>Nomes Comuns:</b> 4-CEC; 4-cloroetacatinona
	<b>Nome IUPAC:</b> (RS)-1-(4-clorofenil)-2-(etilamino)-1-propanona
	<b>Fórmula Molecular:</b> C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> ClNO
	<b>Massa Molar:</b> 211,689 g/mol
	<b>Número CAS:</b> 22198-75-0
	<b>Designação:</b> NSP
	<b>Primeiro Aparecimento no Mercado:</b> 2016
	<b>Abrangência Legal:</b> -

A 4-Cl-PVP é, das cinco catinonas em estudo, a mais recente no mercado, razão pela qual não há ainda informação sobre a sua farmacologia ou padrões de consumo. Da mesma forma, e sendo a 4-Cl-PVP a mais recente catinona a ser detetada das cinco que este estudo aborda, ainda não é possível encontrar-se estudos na bibliografia sobre a sua determinação qualitativa e quantitativa em matrizes biológicas, o que constitui desta forma o maior contributo desta dissertação.

**Tabela 1.6: Informações gerais sobre a 4-Cl-PVP.**

Estrutura	Informações Gerais
	<b>Nomes Comuns:</b> 4-Cl-PVP; 4-cloro-α-PVP; 4-cloro-α-pirrolidinopentiofenona
	<b>Nome IUPAC:</b> (RS)-1-(4-clorofenil)-2-(1-pirrolidinil)-1-pentanona
	<b>Fórmula Molecular:</b> C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> ClNO
	<b>Massa Molar:</b> 265,781 g/mol
	<b>Número CAS:</b> 5537-17-7
	<b>Designação:</b> NSP
	<b>Primeiro Aparecimento no Mercado:</b> 2017
	<b>Abrangência Legal:</b> -

Encontram-se também estudos que focam apenas as técnicas cromatográficas para análise de padrões destas catinonas, razão pela qual não são usadas técnicas de extração e concentração, e que visam apenas a caracterização destes compostos [4, 19, 30].

**Tabela 1.7: Revisão bibliográfica dos métodos validados em matrizes biológicas das catinonas em estudo.**

Critérios	Referências Bibliográficas
Catinonas que Aborda	α-PVP [9, 17, 18, 22, 31]; metilona [9, 17, 22, 25, 27, 31, 68]; MDPV [9, 17, 22, 24, 27, 31]
Matriz Biológica	Sangue [17, 18, 24, 27, 31]; urina [9, 17, 22, 24, 25, 31, 68]
Método de Extração	DLLME [17]; SPE [9, 22, 24, 25, 31]; LLE [68]
Método Cromatográfico	GC-MS [17, 22, 24, 25, 68]; LC-Q/TOF [31]; LC-HRMS [9]; LC-MS(MS) [18, 27]
Padrão Interno	Mefedrona- <i>d</i> <sub>3</sub> [17, 18, 27]; anfetamina- <i>d</i> <sub>11</sub> [22]; MDA- <i>d</i> <sub>5</sub> [22]; butilona- <i>d</i> <sub>3</sub> [22], metaqualona [24]; diazepam- <i>d</i> <sub>5</sub> [24]; metanfetamina- <i>d</i> <sub>5</sub> [24], JWH-210- <i>d</i> <sub>9</sub> [27]; respetivo equivalente deuterado [9, 31, 68]
Reagente Derivatizante	Cloroformato de hexilo [17]; PFPA [22]; HFBA [68]

#### 1.4. Justificação do Tema e Objetivos

Devido ao crescente número de NSP que aparecem no mercado todos os anos, há uma enorme escassez de métodos validados para a triagem e quantificação simultânea de um grande número destes compostos, entre eles os que esta dissertação aborda, principalmente em matrizes biológicas como sangue e urina, pelo que daí sobressai a importância do trabalho em desenvolvimento.

Desta forma, esta dissertação foi desenvolvida no âmbito do protocolo de colaboração entre a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC/PJ) e o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), que visa o estudo de novas substâncias psicoativas em Portugal em consequência do Decreto-Lei nº 54/2013 de 17 de abril e que inclui a validação de técnicas analíticas para uma rápida monitorização destas substâncias em produtos apreendidos e/ou em matrizes biológicas.

Tendo em conta o facto de as catinonas sintéticas serem o segundo maior grupo de NSP, a quantidade de mortes associadas a estas substâncias que foram relatadas nos últimos anos e o elevado volume das apreensões das mesmas, o estudo destes compostos torna-se de elevada importância.

Assim, esta dissertação tem como objetivo desenvolver uma metodologia analítica para determinar qualitativa e quantitativamente a presença de cinco catinonas (4-CEC,  $\alpha$ -PVP, metilona, 4-Cl-PVP e MDPV) em sangue e urina através de um método SPE/GC-MS, de modo a poder ser inserido na rotina laboratorial de um laboratório de toxicologia forense.

## 2. Parte Experimental

Este capítulo irá abordar os diferentes materiais e métodos usados ao longo do trabalho experimental, enumerando os diferentes padrões, reagentes, soluções, equipamentos e técnicas usados. É de referir que o capítulo será dividido em dois segmentos, tendo em conta que a primeira parte do desenvolvimento do trabalho experimental consistiu na obtenção das catinonas a usar como padrões no processo de validação. A segunda parte dirá respeito a todo o processo de desenvolvimento e validação do método analítico para análise de catinonas em sangue.

É de salientar que as estruturas químicas foram obtidas através do *software* ChemDraw Ultra 12.0.2 e as massas moleculares foram calculadas com o auxílio de uma Tabela Periódica dos Elementos de 2007 da Porto Editora. As estruturas químicas, as massas moleculares e os nomes de nomenclatura IUPAC foram confirmados através da base de dados *online* do PubChem.

### 2.1. Obtenção dos Padrões das Cinco Catinonas em Estudo

Os padrões das catinonas 4-CEC e 4-Cl-PVP foram cedidos pelo LPC/PJ, tendo sido provenientes de produtos apreendidos pela Polícia Portuguesa. Por outro lado, os padrões da  $\alpha$ -PVP e da metilona foram sintetizados anteriormente nos laboratórios da FCUL no âmbito de outros trabalhos experimentais. Desta forma, procedeu-se à síntese do padrão em falta, referente à MDPV.

#### 2.1.1. Reagentes, Equipamentos e Procedimentos Experimentais

Os reagentes e solventes usados foram obtidos comercialmente e utilizados sem qualquer purificação adicional, com exceção do THF e da pirrolidina. O THF foi seco com sódio/benzofenona e de seguida destilado [74, 75] e a pirrolidina foi purificada por destilação fracionada e guardada sobre peneiros moleculares de 4 Å.

O piperonilnitrilo a 97% usado foi fornecido pela Alfa Aesar (Massachusetts, EUA). O THF foi adquirido à CARLO ERBA Reagents S.r.l. (Milão, Itália), bem como o acetato de etilo, o sulfato de sódio anidro e a acetona. O cloreto de butilmagnésio, o diclorometano e a pirrolidina a 99% foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O éter de petróleo foi adquirido na VWR Prolabo Chemicals (Fontenay-sous-Bois, França), e o éter dietílico na Honeywell (Nova Jersey, EUA). O ácido sulfúrico a 96% foi adquirido na Panreac (Barcelona, Espanha). As soluções de ácido clorídrico 6 M e hidróxido de sódio 5 M encontravam-se previamente feitas.

As reações foram seguidas por cromatografia em camada fina (*thin layer chromatography*, TLC), tendo sido utilizadas placas de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> da marca Merck (Darmstadt, Alemanha) com 0,2 mm de espessura. Os cromatogramas foram visualizados sob luz UV de 254 nm em câmara de iodo da marca Camag (Muttentz, Suíça).

Para a concentração das amostras usou-se um evaporador rotativo Büchi (Flawil, Suíça) Heating Bath B-490 com bomba de vácuo Büchi Rotavapor modelo R-200.

A linha de vácuo usada para adicionar o reagente de Grignard possuía uma linha de alto vácuo com uma bomba Vacuubrand (Wertheim, Alemanha), modelo GSP 3000.

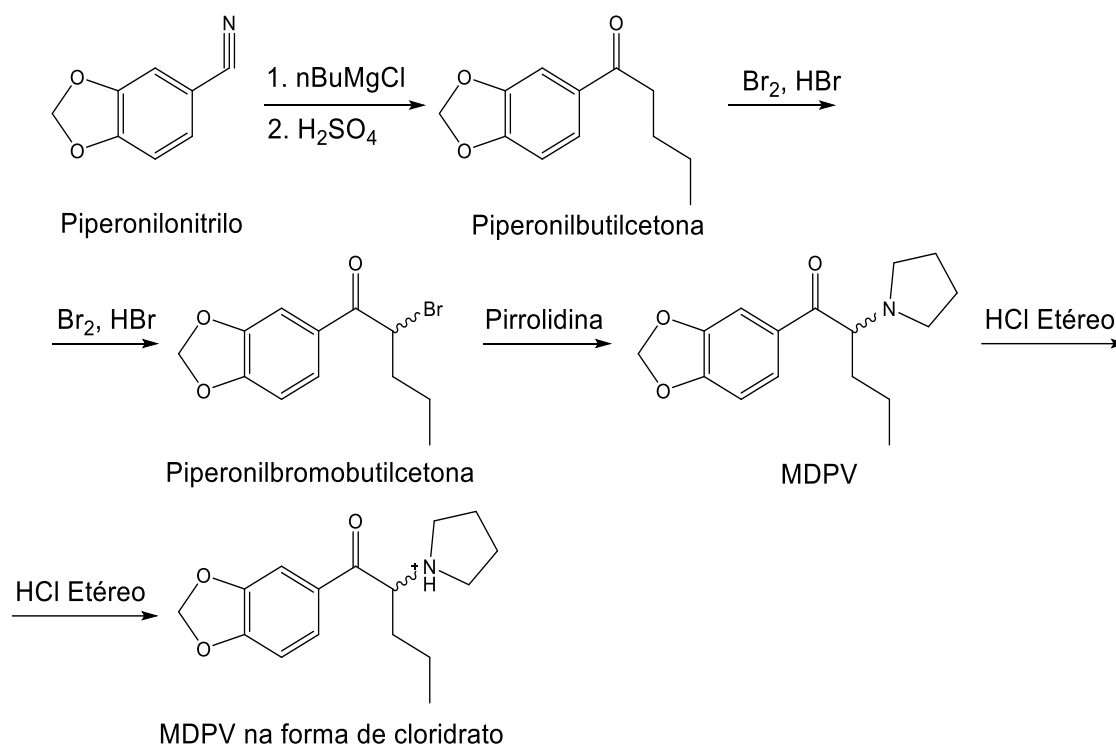
As pesagens foram efetuadas em balanças Mettler Toledo (Ohio, EUA) modelo PR1203 com resolução de  $\pm 0,001$  g e OHAUS Pioneer® (Ohio, EUA), modelo PA224 com resolução de  $\pm 0,0001$  g.

Para as análises em Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), foi usado um espectrofotômetro Brüker (Massachusetts, EUA) Avance 400 Ultra Shield, cujas frequências dos núcleos de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  são de 400.13 e 100.61 MHz, respectivamente. Foram realizadas experiências 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  APT e 2D HSQC editado, HMBC e COSY. Os solventes usados foram DMSO- $d_6$ , da marca Eurisotop (St-Aubin, França), e  $\text{CDCl}_3$  da marca Cambridge Isotope Laboratories (Massachusetts, EUA) e todos os desvios químicos foram ajustados ao sinal residual do solvente, correspondendo a  $\delta_{\text{H}} = 2.50$  ppm e  $\delta_{\text{C}} = 39.50$  ppm para o DMSO- $d_6$ , e  $\delta_{\text{H}} = 6.01$  ppm e  $\delta_{\text{C}} = 77.00$  ppm para o  $\text{CDCl}_3$ . Os espectros resultantes foram tratados através do *software* Brüker TopSpin 3.5 pl 5. Para a análise em Espectroscopia de NMR, dissolveu-se cerca de 8 a 20 mg de cada amostra em 500  $\mu\text{L}$  de solvente.

Para as análises em GC-FID, foi usado um cromatógrafo da marca Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha) GC System 7890B, com detetor de ionização de chama. O injetor automático usado foi adquirido à Agilent Technologies e era do modelo Autosampler 7693, e a coluna capilar era o modelo HP-5 19091J-413 da mesma marca, tinha 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme. O gás de arraste foi o hélio e a injeção foi feita em modo *split*. O programa usado foi o "ANFET1" que se inicia com uma temperatura de 80 °C (1 min), subindo gradualmente até aos 270 °C, a uma velocidade de 12 °C por minuto, num total de 23,833 minutos de corrida.

### 2.1.2. Síntese do Padrão de MDPV

Na Figura 2.1 encontram-se sumarizadas as quatro etapas da síntese desta catinona.

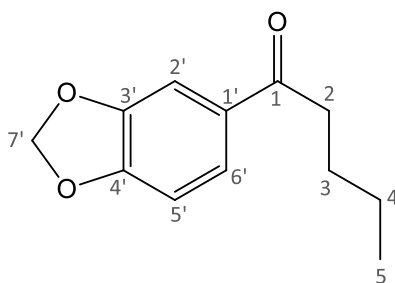


**Figura 2.1:** Esquema global das quatro etapas envolvidas na síntese de MDPV na forma de cloridrato.

Numa primeira fase, foi necessário diluir piperonitrilo (1,85 g; 1,257 mmol) em THF seco (8,0 mL; 9,874 mmol) de modo a não degradar o reagente de Grignard na adição que se seguiria. Para tal, adicionou-se fio de sódio e benzofenona a um balão com 500 mL de THF, que posteriormente se colocou a destilar [74, 75]. De seguida, e após desarejamento em corrente de azoto, foi realizada a adição nucleofílica do piperonitrilo em THF ao reagente de Grignard – cloreto de butilmagnésio (10,39 mL; 8,552 mmol) – aos poucos, durante cerca de 45 minutos e com a ajuda de uma seringa, de modo a formar uma imina intermediária (Anexo A, Figura 6.1) [76].

A reação foi seguida por TLC, tendo-se usado como padrão piperonitrilo em diclorometano e como eluente uma mistura de éter de petróleo/acetato de etilo (9:1). A mistura reacional foi aquecida e colocada sobre um banho de areia e deixou-se em agitação durante a noite. Assim que o piperonitrilo reagiu completamente, foram adicionados 8 g de gelo à mistura reacional. Após arrefecimento, adicionou-se lentamente ácido sulfúrico a 96% (1,91 mL; 3,584 mmol) [76], e é este *work-up* ácido da imina com ácido sulfúrico concentrado que desloca de forma irreversível o equilíbrio na formação da piperonilbutilcetona [77]. De seguida, procedeu-se à evaporação do THF no evaporador rotativo, pois este era miscível em água. Extraíu-se a fase aquosa com éter dietílico (3 x 60 mL) e diclorometano (1 x 50 mL) e as duas fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro e filtradas por gravidade [76]. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida e obtiveram-se assim dois óleos castanhos (1,34 g; 0,650 mmol) (0,08 g; 0,039 mmol) (Anexo A,

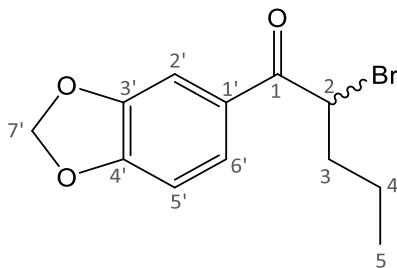
Figura 6.2) [76]. Por fim, fez-se uma TLC deste produto intermediário em éter de petróleo/acetato de etilo (8:2), tendo-se verificado que os fatores de retenção do piperonilnitrilo e da piperonilbutilcetona eram de 0,46 e 0,44, respectivamente. Acabou por se usar apenas o primeiro óleo, pois o segundo aparentava por TLC estar bastante sujo. Nesta primeira fase, obteve-se assim a piperonilbutilcetona (Figura 2.2).



**Figura 2.2: Estrutura numerada da piperonilbutilcetona.**

**Piperonilbutilcetona:**  $^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.54 (1H, *d*, H6'), 7.41 (1H, *s*, H2'), 6.82 (1H, *d*, H5'), 6.01 (2H, *s*, H7'), 2.86 (2H, *t*, H2), 1.67 (2H, *m*, H3), 1.37 (2H, *m*, H4), 0.92 (3H, *t*, H5).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198.61 (C=O, C1), 151.45 (Cq, C4'), 148.04 (Cq, C3'), 131.85 (Cq, C1'), 124.13 (CH, C6'), 107.81 (CH, C2'), 107.72 (CH, C5'), 101.71 ( $\text{CH}_2$ , C7'), 38.03 ( $\text{CH}_2$ , C2), 26.66 ( $\text{CH}_2$ , C3), 22.42 ( $\text{CH}_2$ , C4), 13.88 ( $\text{CH}_3$ , C5) (Anexo A, Figuras 6.3 a 6.9).

Numa segunda fase, começou-se por adicionar a uma solução de piperonilbutilcetona (1,34 g; 0,650 mmol) diclorometano seco (1,32 mL; 3,633 mmol), uma gota de ácido bromídrico e, lentamente e durante 15 minutos, bromo molecular (0,24 mL; 0,474 mmol) (Anexo A, Figura 6.10). A seringa pela qual se deu a introdução do bromo molecular no sistema foi lavada com diclorometano seco para garantir que todo o bromo medido poderia reagir [78]. O balão reacional foi colocado sobre gelo e a reação deixou-se em agitação durante a noite. A reação de bromação foi seguida por TLC, tendo-se usado como eluente uma mistura de éter de petróleo/éter dietílico (9:1), e tendo-se verificado que o fator de retenção da piperonilbromobutilcetona era de 0,25. Através da TLC foi também possível verificar a presença do composto dibromado, cujo fator de retenção era de 0,48. Evaporou-se o diclorometano a pressão reduzida, tendo-se obtido um óleo castanho (1,467 g, 0,514 mmol). Obteve-se assim a piperonilbromobutilcetona (Figura 2.3).



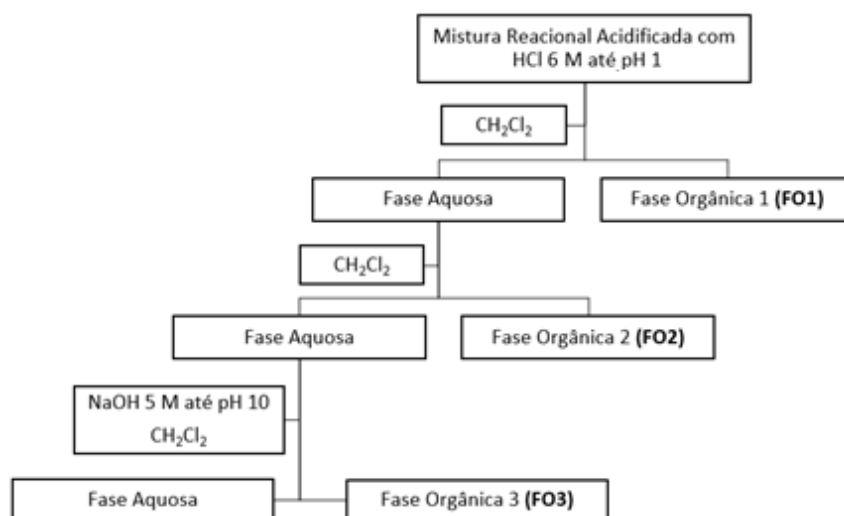
**Figura 2.3:** Estrutura numerada da piperonilbromobutilcetona.

**Piperonilbromobutilcetona:**  $^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.62 (1H, *d*, H6'), 7.48 (1H, *s*, H2'), 6.87 (1H, *d*, H5'), 6.05 (2H, *s*, H7'), 5.06 (1H, *t*, H2), 2.12 (2H, *m*, H3), 1.48 (2H, *m*, H4), 0.97 (3H, *t*, H5).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  191.50 (C=O, C1), 152.24 (Cq, C4'), 148.31 (Cq, C3'), 129.03 (Cq, C1'), 125.15 (CH, C6'), 108.60 (CH, C2'), 108.00 (CH, C5'), 102.01 (CH<sub>2</sub>, C7'), 46.83 (CH, C2), 35.55 (CH<sub>2</sub>, C3), 20.74 (CH<sub>2</sub>, C4), 13.54 (CH<sub>3</sub>, C5) (Anexo A, Figuras 6.11 a 6.17).

Para dar início à terceira etapa, a uma solução de piperonilbromobutilcetona (1,467 g, 0,514 mmol) adicionou-se diclorometano (7,51 mL; 11,760 mmol) e pirrolidina destilada (1,00 mL; 1,198 mmol) (Anexo A, Figura 6.18). A reação foi seguida por TLC, tendo-se usado como eluente uma mistura de éter de petróleo/éter dietílico (8:2). A reação foi deixada em agitação durante a noite [78].

De seguida, acidificou-se a mistura reacional bruta com ácido clorídrico 6 M até pH 1 e extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (1 x 25 mL), obtendo-se a fase orgânica 1 (FO1). À fase aquosa adicionou-se diclorometano (1 x 25 mL) e basificou-se com hidróxido de sódio 5 M até pH 11. Retirou-se a FO2 e extraiu-se a fase aquosa novamente com diclorometano (1 x 25 mL), obtendo-se a FO3. Estas extrações seguiram assim o esquema da Figura 2.4. As três fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas por gravidade e concentradas em vácuo, tendo-se obtido um óleo castanho na FO1 (0,634 g; 0,230 mmol), um óleo castanho na FO2 (0,357 g; 0,130 mmol) e um óleo castanho-alaranjado na FO3 (0,504 g; 0,183 mmol) [78]. Obteve-se assim MDPV na forma de base livre.





**Figura 2.4:** Esquema para a extração da MDPV na forma de base livre.

De seguida foi preparada uma solução de ácido clorídrico etéreo, sendo que para tal se colocou previamente cloreto de sódio (43,83 g; 750 mmol) na estufa, onde ficou cerca de dois dias a 100 °C. O ácido clorídrico etéreo foi obtido através da adição gota a gota de ácido sulfúrico a 96% (19,19 mL; 375 mmol) sobre o cloreto de sódio já seco. Formou-se assim ácido clorídrico, que borbulhou em éter etílico (250 mL; 750 mmol) durante 3 horas e 5 minutos, até o sistema estar estabilizado. De notar que no primeiro frasco lavador se colocou uma quantidade do mesmo ácido para que a corrente gasosa de ácido clorídrico borbulhasse aquando da sua passagem por este primeiro frasco.

Por fim, foi necessário fazer uma reação ácido-base entre a MDPV na forma de base livre e ácido clorídrico etéreo, para que se desse a precipitação do cloridrato de MDPV, tendo-se adicionado ácido clorídrico etéreo 3 M às três fases orgânicas obtidas (Anexo A, Figura 6.19) [76]. No balão correspondente à FO3 formou-se um precipitado esbranquiçado e uma pasta oleosa que só se conseguiu dissolver ao fim de bastante tempo. Na FO1 e na FO2 formaram-se precipitados mais escuros, especialmente na FO1.

De seguida, os precipitados foram filtrados em vácuo e lavados com éter dietílico. Procedeu-se de seguida à purificação dos precipitados através de uma lavagem dos mesmos com uma mistura de acetona/éter dietílico (1:1) fria. Neste processo foram-se também adicionando pequenas quantidades de ácido clorídrico etéreo e os recipientes foram mantidos sobre gelo [78]. Os precipitados foram novamente filtrados por vácuo, e o precipitado proveniente da FO3 foi lavado mais duas vezes com a mistura de acetona/éter dietílico (1:1). O processo resultou assim em três precipitados, provenientes das FO1 (0,377 g; 0,136 mmol), FO2 (0,231 g; 0,084 mmol) e FO3 (0,134 g; 0,048 mmol). De seguida, foram feitas análises de NMR <sup>1</sup>H aos três precipitados para testar a pureza dos mesmos, tendo-se acabado por usar para os fins deste trabalho experimental o precipitado proveniente da FO2.

### 2.1.3. Caracterização Estrutural dos Compostos em Estudo

Neste tópico encontram-se descritas as caracterizações estruturais de cada um dos compostos usados no estudo em mãos, realizadas através da técnica de NMR [79, 80]. É de referenciar que os dados NMR estão de acordo com a literatura, enunciada na caracterização de cada molécula. Foram também realizadas análises por GC-FID, sendo que os resultados dizem respeito à média de dez análises, encontrando-se em anexo apenas um cromatograma GC-FID para cada composto. A Figura 2.5 representa a estrutura numerada das moléculas em estudo.

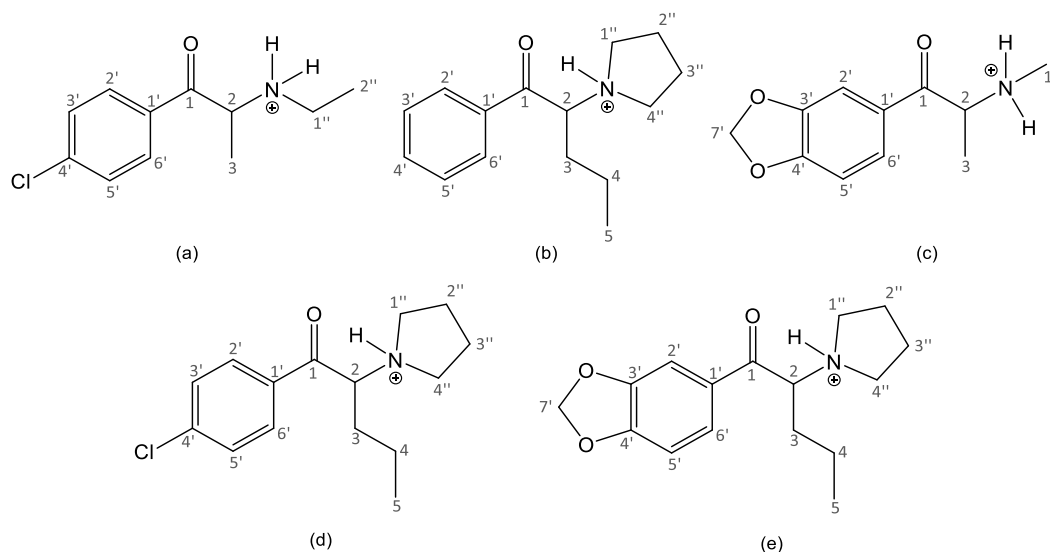


Figura 2.5: Estrutura numerada das moléculas de (a) 4-CEC, (b)  $\alpha$ -PVP, (c) metilona, (d) 4-Cl-PVP e (e) MDPV.

**4-CEC:**  $^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.75 (1H, s, NH), 9.25 (1H, s, NH), 8.09 (2H, d, H2'/H6'), 7.69 (1H, d, H3'/H5'), 5.22 (1H, q, H2), 2.98 (2H, m, H1''), 1.46 (3H, d, H3), 1.28 (3H, t, H2'').  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  195.43 (C=O, C1), 139.65 (Cq, C1'/C4'), 131.66 (Cq, C1'/C4'), 130.78 (CH, C2'/C6'), 129.33 (CH, C3'/C5'), 56.69 (CH, C2), 40.26 (CH<sub>2</sub>, C1''), 15.47 (CH<sub>3</sub>, C3), 11.15 (CH<sub>3</sub>, C2'') (Anexo B, Figuras 6.20 a 6.26) [19]. GC-FID: Área do Pico: 99,81% (ST 0,06, CV 0,06%).  $t_R$ : 9.46 min (ST 0,010, CV 0,10%) (Anexo B, Figura 6.27).

**$\alpha$ -PVP:**  $^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  10.28 (1H, NH), 8.09 (2H, d, H2'/H6'), 7.79 (1H, t, H4'), 7.64 (2H, t, H3'/H5'), 5.55 (1H, m, H2), 3.62 (1H, m, H1''/H4''), 3.49 (1H, m, H1''/H4''), 3.25 (1H, m, H1''/H4''), 3.05 (1H, m, H1''/H4''), 1.85-2.11 (2H, m, H2''/H3''), 1.93 (2H, m, H3), 1.23 (1H, m, H4), 1.02 (1H, m, H4), 0.78 (3H, t, H5).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  196.69 (C=O, C1), 135.10 (CH, C4'), 134.22 (Cq, C1'), 129.30 (CH, C3'/C5'), 128.87 (CH, C2'/C6'), 67.65 (CH, C2), 53.98 (CH<sub>2</sub>, C1''/C4''), 51.89 (CH<sub>2</sub>, C1''/C4''), 31.75 (CH<sub>2</sub>, C3), 22.82 (CH<sub>2</sub>, C2''/C3''), 22.80 (CH<sub>2</sub>, C2''/C3''), 17.16

(CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 13.66 (CH<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>) (Anexo B, Figuras 6.28 a 6.35) [81]. GC-FID: Área do Pico: 99,34% (ST 0,06, CV 0,06%). t<sub>R</sub>: 11.53 min (ST 0,041, CV 0,35%) (Anexo B, Figura 6.36).

**Metilona:** <sup>1</sup>H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.69 (1H, *s*, NH), 9.17 (1H, *s*, NH), 7.69 (1H, *dd*, H<sub>6'</sub>), 7.53 (1H, *s*, H<sub>2'</sub>), 7.12 (1H, *d*, H<sub>5'</sub>), 6.19 (2H, *s*, H<sub>7'</sub>), 5.09 (1H, *q*, H<sub>2</sub>), 2.55 (3H, *s*, H<sub>1''</sub>), 1.43 (3H, *d*, H<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 194.35 (C=O, C<sub>1</sub>), 152.74 (C<sub>q</sub>, C<sub>4'</sub>), 148.23 (C<sub>q</sub>, C<sub>3'</sub>), 127.39 (C<sub>q</sub>, C<sub>1'</sub>), 125.85 (CH, C<sub>6'</sub>), 108.58 (CH, C<sub>5'</sub>), 107.92 (CH, C<sub>2'</sub>), 102.50 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7'</sub>), 57.96 (CH, C<sub>2</sub>), 30.64 (CH<sub>3</sub>, C<sub>1''</sub>), 15.76 (CH<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>) (Anexo B, Figuras 6.37 a 6.43) [82]. GC-FID: Área do Pico: 98,25% (ST 0,11, CV 0,11%). T<sub>R</sub>: 10.94 min (ST 0,005, CV 0,04%) (Anexo B, Figura 6.44).

**4-Cl-PVP:** <sup>1</sup>H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.17 (1H, *s*, NH), 8.10 (2H, *d*, H<sub>2'/H6'</sub>), 7.73 (2H, *d*, H<sub>3'/H5'</sub>), 5.52 (1H, *s*, H<sub>2</sub>), 3.61 (1H, *s*, H<sub>2''</sub>), 3.48 (1H, *s*, H<sub>2''</sub>), 3.23 (1H, *s*, H<sub>5''</sub>), 3.06 (1H, *s*, H<sub>5''</sub>), 2.05 (5H, *m*, H<sub>3''/H4''</sub>), 1.91 (1H, *m*, H<sub>3</sub>), 1.20 (1H, *m*, H<sub>3''/H4''</sub>), 1.01 (1H, *m*, H<sub>3''/H4''</sub>), 0.78 (3H, *t*, H<sub>5</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 195.78 (C=O, C<sub>1</sub>), 140.14 (C<sub>q</sub>, C<sub>1'</sub>), 135.82 (C<sub>q</sub>, C<sub>4'</sub>), 130.80 (CH, C<sub>3'/C5'</sub>), 129.47 (CH, C<sub>2'/C6'</sub>), 67.77 (CH, C<sub>2</sub>), 54.09 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2''</sub>), 51.93 (CH<sub>2</sub>, 1''), 31.63 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 22.81 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3''/C4''</sub>), 17.08 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 13.65 (CH<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>) (Anexo B, Figuras 6.45 a 6.53) [83]. GC-FID: Área do Pico: 98,99% (ST 0,04, CV 0,04%). t<sub>R</sub>: 13.06 min (ST 0,012, CV 0,09%) (Anexo B, Figura 6.54).

**MDPV:** <sup>1</sup>H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.26 (1H, *s*, NH), 7.77 (1H, *d*, H<sub>6'</sub>), 7.57 (1H, *s*, H<sub>2'</sub>), 7.16 (1H, *d*, H<sub>5'</sub>), 6.20 (2H, *d*, H<sub>7'</sub>), 5.45 (1H, *d*, H<sub>2</sub>), 3.60 (3H, *m*, H<sub>1''/H4''</sub>), 3.22 (3H, *m*, H<sub>1''/H4''</sub>), 3.00 (3H, *m*, H<sub>1''/H4''</sub>), 1.89-2.04 (6H, *m*, H<sub>3/H2''/H3''</sub>), 1.12 (2H, *m*, H<sub>4</sub>), 0.79 (3H, *t*, H<sub>5</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 194.54 (C=O, C<sub>1</sub>), 153.19 (C<sub>q</sub>, C<sub>4'</sub>), 148.37 (C<sub>q</sub>, C<sub>3'</sub>), 128.96 (C<sub>q</sub>, C<sub>1'</sub>), 126.24 (CH, C<sub>6'</sub>), 108.65 (CH, C<sub>5'</sub>), 107.86 (CH, C<sub>2'</sub>), 102.68 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7'</sub>), 67.16 (CH, C<sub>2</sub>), 53.82 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1''/C4''</sub>), 51.90 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1''/C4''</sub>), 32.08 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 22.83 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2''/C3''</sub>), 17.35 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 13.74 (CH<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>) (Anexo B, Figuras 6.55 a 6.62) [84]. GC-FID: Área do Pico: 99,28% (ST 0,12, CV 0,12%). t<sub>R</sub>: 14.81 min (ST 0,002, CV 0,01%) (Anexo B, Figura 6.63).

## 2.2. Desenvolvimento e Validação do Método Analítico

A segunda parte deste capítulo abordará então todos os passos do desenvolvimento e da validação do método analítico.

### 2.2.1. Reagentes

O dihidrogenofosfato de potássio usado para fazer a solução tampão de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, pH  $6,0 \pm 0,1$ ) foi obtido na Panreac (Barcelona, Espanha).

As soluções de benzoilecgonina- $d_3$  e de cocaína- $d_3$  usadas para fazer as soluções de padrão interno foram adquiridas à Cerilliant (Round Rock, EUA), e possuíam grau de pureza de 99,7% e 99,3%, respetivamente. O acetonitrilo usado para fazer as soluções de padrão interno foi obtido na marca Fluka Analytical/Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

O metanol usado foi fornecido pela VWR Prolabo Chemicals (Fontenay-sous-Bois, França).

A água desionizada foi produzida num sistema de purificação de água modelo Simplicity 185 (com lâmpada de UV) da Millipore (Bedford, EUA) e possuía uma resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$  à temperatura ambiente. O ácido clorídrico a 25% usado para fazer a solução de HCl 5 M pertencia à marca Merck (Darmstadt, Alemanha), bem como o diclorometano, o isopropanol e a amónia a 25%.

O *n*-hexano usado na extração em fase sólida proveio da marca CARLO ERBA Reagents S.r.l. (Milão, Itália).

Os reagentes de derivatização MBTFA (*N*-metil-bis-trifluoroacetamida) MSTFA (*N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida) e TMCS (trimetilclorosilano) foram adquiridos na Macherey-Nagel (Düren, Alemanha). Por sua vez, o acetato de etilo para GC foi obtido na Merck (Darmstadt, Alemanha).

Todos os solventes orgânicos utilizados possuíam grau de pureza *pro analysi* com exceção do acetonitrilo, que possuía grau de pureza LC-MS *grade*.

### 2.2.2. Soluções

As soluções padrão de cada uma das catinonas foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/mL. Assim, para um balão aferido de 5 mL, foram pesados 5 mg de cada composto, e foi adicionado metanol até perfazer um volume final de 5 mL.

A primeira solução das cinco catinonas, de concentração 5 µg/mL, foi feita sem grande rigorosidade, tendo em conta que foi usada apenas nos primeiros testes para a otimização do método. Para tal, colocou-se num tubo de plástico 10 mL de metanol e 50 µL de cada solução padrão.

Para as soluções de trabalho (usadas no processo de validação) foram feitas soluções de 10 µg/mL e de 1 µg/mL. Para a primeira, retiraram-se 100 µL de cada solução padrão e perfez-se com metanol até um volume de 10 mL, num balão volumétrico com essa capacidade. Para a segunda, retirou-se 1 mL da solução de 10 µg/mL e perfez-se com metanol até um volume de 10 mL, mais uma vez num balão volumétrico com essa capacidade. Adicionalmente foram ainda preparadas duas soluções independentes de igual concentração com vista à preparação de amostras controlo.

Foi preparada uma solução de padrão interno com benzoilecgonina- $d_3$  e cocaína- $d_3$  em acetonitrilo e de concentração 5 µg/mL. Para tal, retiraram-se 50 µL de benzoilecgonina- $d_3$  e 50 µL de cocaína- $d_3$  e perfez-se com acetonitrilo até um volume de 10 mL.

Todas as soluções enumeradas anteriormente foram guardadas a -20 °C, ao abrigo da luz.

Para preparar a solução tampão de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, pH 6,0  $\pm$  0,1), pesaram-se 13,61 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  que foram diluídos em água desionizada com a ajuda de um banho ultrassónico. A solução foi então transferida para um balão volumétrico de 1000 mL, tendo-se adicionado de seguida água desionizada até perfazer o volume pretendido. Esta solução foi guardada à temperatura ambiente.

Para a solução de HCl 5 M colocaram-se 64,3 mL de ácido clorídrico a 25% num balão volumétrico de 100 mL e perfez-se com água desionizada.

Para as soluções de HCl 0,1 M, mediram-se 5 mL de HCl 5 M e perfez-se com água desionizada num balão volumétrico de 250 mL.

As soluções de diclorometano:isopropanol:amónia (78:20:2, v/v/v) foram preparadas num frasco de 250 mL, para onde se pipetaram 156 mL de diclorometano, 40 mL de isopropanol e 4 mL de amónia a 25%.

A solução de diclorometano:metanol (70:30, v/v) foi preparada adicionando 140 mL de diclorometano a 60 mL de metanol num frasco de vidro de 250 mL.

Para fazer a solução de diclorometano:isopropanol (75:25, v/v), colocaram-se 150 mL de diclorometano e 50 mL de isopropanol num frasco de vidro de 250 mL.

Para a solução de MSTFA:TMCS (95:5, v/v) foram colocados 19 mL de MSTFA e 1 mL de TMCS num frasco.

Todas estas soluções foram homogeneizadas por inversão e guardadas a 6 °C, ao abrigo da luz.

Para a solução de metanol a 5%, colocaram-se 1 mL de metanol e 19 mL de água desionizada num gobelet, tendo em conta que era uma solução que ia ser usada apenas naquela altura. Da mesma forma, para a solução de metanol a 10% colocaram-se 2 mL de metanol e 18 mL de água desionizada noutro gobelet. O mesmo aconteceu para as soluções de isopropanol a 5% (1 mL de isopropanol com 19 mL de água desionizada) e de isopropanol a 10% (2 mL de isopropanol com 18 mL de água desionizada).

### **2.2.3. Equipamentos e Materiais**

Para fazer as pesagens necessárias para a preparação das várias soluções, foi usada uma balança analítica da Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Alemanha), modelo 770-13 com resolução de  $\pm$  0,0001 g, bem como uma balança da Denver Instruments (Nova Iorque, EUA), modelo XS-410 com resolução de  $\pm$  0,01 g.

Também para a preparação das soluções, foi usado um banho ultrassónico da Elma (Singen, Alemanha), modelo Transsonic 570/H.

Como referido anteriormente, o sistema de purificação de água usado para preparar água desionizada foi o modelo Simplicity 185 (com lâmpada de UV) da Millipore (Bedford, EUA).

Foi também usado um equipamento vortex da Retsch (Haan, Alemanha) e, para homogeneizar as amostras, foi usado um homogeneizador modelo SRT9 da Stuart Scientific (Redhill Surrey, Reino Unido), bem como uma centrífugadora da Thermo-Heraeus (Osterode, Alemanha), modelo Megafuge 1.0.

O dispensador usado foi o modelo Multipipette plus da Eppendorf (Madrid, Espanha) e as micropipetas automáticas de 10-100 µL e de 100-1000 µL foram as de modelo Reference da Eppendorf (Madrid, Espanha). As pontas das pipetas também foram adquiridas à Eppendorf (Madrid, Espanha).

As câmaras para extração em fase sólida manual possuíam capacidade para 20 colunas e foram adquiridas à Agilent Technologies (Palo Alto, EUA), tendo sido associadas a uma bomba de vácuo fornecida pela Gast Manufacturing, Inc. (Bentley Harbor, EUA), de modelo DOA-P504-BN.

As colunas de extração em fase sólida usadas eram da marca Oasis<sup>®</sup> HLB (60 mg de enchimento, 3 mL de volume) e Oasis<sup>®</sup> MCX (60 mg de enchimento, 3 mL de volume) e foram fornecidas pela Waters Corporation<sup>®</sup> (Milford, EUA).

Para evaporar as amostras sob corrente de azoto foi usado um evaporador do modelo TurboVap<sup>®</sup> LV da Caliper LifeSciences (Cambridge, Reino Unido).

O banho seco usado foi fornecido pela Grant Instruments Ltd. (Cambridge, Reino Unido), pertencendo ao modelo QBT2.

O encapsulador usado era da marca Agilent Technologies (Palo Alto, EUA) e o desencapsulador era da marca Chromacol (Welwyn Garden City, Reino Unido).

Por último, foi usado um cromatógrafo de gases da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha), modelo 6890N, acoplado a um espectrómetro de massa da mesma marca, de modelo 5973 Inert. O cromatógrafo estava acoplado a um injetor automático também da Agilent Technologies, modelo 7683.

A coluna capilar usada pertencia também à Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha) e era de sílica fundida HP-5MS (sendo a fase estacionária de fenilmetilpolisiloxano 5%), tinha 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

Foram também usados *liners* de 4 mm de diâmetro interno para *split* da Agilent Technologies (Palo Alto, EUA), bem como lã de vidro fornecida pela mesma marca. Os septos usados foram fornecidos pela Agilent Technologies, modelo Agilent Premium Inlet Septa e possuíam 11 mm de diâmetro. Os *o-rings* usados foram também fornecidos pela Agilent Technologies.

Para a aquisição e tratamento de dados, foram usados os *softwares* Enhanced ChemStation MSD Chem Station versão E.02.00493 de 2008, da Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA).

#### 2.2.4. Condições Cromatográficas

A temperatura inicial do forno foi de 90 °C, mantida durante 2,00 minutos e seguida por um gradiente térmico de 20 °C por minuto até aos 300 °C. A temperatura final foi mantida durante 2,50 minutos e a temperatura do injetor e do detetor (interface) foram mantidas a 220 °C e 280 °C, respetivamente. Este programa de temperaturas foi desenvolvido de modo a obter uma eficiência separativa adequada.

O volume de injeção foi de 2 µL em modo *split* e com uma razão de *split* de 1:5. O gás de arraste usado como fase móvel foi o hélio, de pureza > 99,9996%, da marca Praxair (Maia, Portugal), a um fluxo constante de 0,8 mL/min.

O espectrómetro de massa foi usado no modo EI, em modo positivo e com uma energia de 70 eV. Em modo de varrimento contínuo (*full scan*) foi feito um varrimento num intervalo de razões *m/z* de 50 a 550 u.m.a. No modo SIM foram selecionados três fragmentos iónicos para cada composto em estudo. O analisador de massa usado foi do tipo quadrupolo. O atraso do solvente foi de 7,50 minutos. Os *liners* utilizados foram substituídos a cada 100 análises, de modo a prevenir a diminuição da sensibilidade.

#### 2.2.5. Amostras Biológicas

As amostras brancas de sangue usadas durante a otimização e validação do método analítico foram colhidas *post mortem* em autópsias médico-legais efetuadas no Serviço de Patologia Forense da Delegação do Sul do INMLCF ou nos Gabinetes Médico-Legais que atuam na sua dependência, e datam de 2017.

As amostras de sangue escolhidas para testar o método analítico eram amostras de 2015, 2016 e 2017, sendo que umas diziam respeito a sangue cardíaco e periférico colhidas *post mortem* e as restantes eram amostras relacionadas com a condução influenciada, ao abrigo do Código da Estrada.

As amostras brancas de urina foram obtidas de voluntários do Serviço de Química e Toxicologia Forense (STQF), não consumidores de drogas ou medicamentos.

Todas estas amostras foram conservadas por congelação a -10 °C.

#### 2.2.6. Identificação dos Compostos

Para a identificação por GC-MS em modo SIM dos compostos presentes nas amostras biológicas em estudo foram usados os critérios da Agência Mundial Antidopagem (*World Anti-Doping Agency*, WADA), sendo necessária a identificação de três iões presentes no espectro de massa, bem como a monitorização das suas intensidades relativas [85].

A intensidade relativa de um fragmento diagnóstico corresponde à percentagem da intensidade do ião mais intenso, que diz respeito ao pico base e corresponde a 100%. Assim, este valor é determinado através da integração da área do pico cromatográfico selecionado e normalizado ao pico base e é verificada pela comparação com o observado nas amostras controlo. Os intervalos de aceitação permitidos para as

abundâncias relativas utilizados na identificação dos compostos em estudo estão discriminados na Tabela 2.1 [85].

**Tabela 2.1: Intervalos máximos de tolerância permitidos para as intensidades relativas dos iões de diagnóstico monitorizados em modo SIM [85].**

Intensidade Relativa (%)	Intervalo Máximo de Tolerância Permitido (%)
> 50	± 10 (intervalo absoluto)
25 – 50	± 20 (intervalo relativo)
5 – 25	± 5 (intervalo absoluto)
< 5	± 50 (intervalo relativo)

A razão sinal/ruído (S/N) diz respeito à razão entre o sinal do ião diagnóstico menos intenso e o sinal correspondente ao ruído da linha de base. Numa análise qualitativa por GC-MS, e ainda de acordo com os critérios da WADA, este fator tem de ser superior a 3:1, e esta determinação é feita através do *software* do equipamento e através da comparação da intensidade relativa do ião diagnóstico com a intensidade relativa da razão  $m/z$  da linha de base adjacente ao pico do composto [85].

Ainda tendo em conta os critérios da WADA, é de referir que a variação do tempo de retenção do composto tem de ser inferior a 2% ou a  $\pm 0,1$  minutos em relação ao tempo de retenção do mesmo composto na amostra de referência (ou de controlo) [85].

Sendo o padrão interno sujeito às mesmas condições analíticas dos compostos a analisar durante a separação cromatográfica, o tempo de retenção do analito pode ser calculado relativamente ao tempo de retenção do padrão interno (tempo de retenção relativo,  $t_{Rr}$ ), de forma a minimizar diferenças no tempo de retenção que ocorrem em corridas diferentes. Assim, o tempo de retenção relativo do sinal cromatográfico da substância a analisar tem de ser menor ou igual a 1% relativamente ao da mesma substância presente na amostra controlo, isto no caso de não se utilizar um análogo deuterado como padrão interno. Caso contrário, a variação do tempo de retenção relativo do composto deverá ser inferior a 0,1%. É também de realçar que este valor é calculado dividindo o tempo de retenção do composto pelo tempo de retenção do padrão interno [85].

É de referir que neste passo do trabalho experimental verificou-se não ser possível incluir a metilona no processo de validação, pois os espectros de massa em modo SIM desta molécula apresentavam fragmentos iónicos com baixa abundância com a consequente falta de sensibilidade, impossibilitando a adequada identificação do composto. A validação do método prosseguiu apenas para as restantes quatro catinonas.

#### **2.2.7. Otimização do Método Analítico**

O método analítico foi previamente otimizado, com vista à obtenção das melhores condições de análise, tendo sido testados vários protocolos de extração (com diferentes tipos de colunas e solventes). Foram então testados vários solventes para a remoção de interferentes originários das amostras biológicas e dois tipos de



colunas de extração. Em todos estes protocolos a amostra consistia em 500 µL de sangue diluídos em 8 mL de tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, pH  $6,0 \pm 0,1$ ), fortificados com cada um dos compostos em estudo à concentração de 250 ng/mL. A mesma concentração foi utilizada para os padrões internos, sendo de salientar que também a escolha deste foi sujeita a uma otimização. Foram também estudados dois reagentes derivatizantes.

#### **2.2.8. Quantificação**

A análise quantitativa foi efetuada através do método da adição de padrão interno, em que este é adicionado à amostra, numa determinada concentração, antes de se proceder à análise. Através deste método são minimizadas as fontes de variabilidade introduzidas nas diversas etapas do processo de tratamento da amostra, possibilitando compensar erros que possam provir do método [86, 87, 88].

O padrão interno escolhido deve obedecer a diversos critérios. Em primeiro lugar, deve possuir propriedades físico-químicas semelhantes às do analito em estudo, não deve reagir com o analito ou com outro qualquer componente da matriz e não deve fazer parte da amostra. Idealmente, o padrão interno deveria ser o equivalente deuterado do composto em estudo; no entanto, tendo em conta o custo deste tipo de compostos e o facto de não existirem análogos deuterados disponíveis comercialmente para todas as substâncias, é habitual usar outros compostos como padrões internos [87, 88].

Na escolha do padrão interno a usar, foram feitos testes com dois padrões internos diferentes: a benzoilecognina- $d_3$  e a cocaína- $d_3$ , tendo-se acabado por usar na validação do método analítico uma solução de ambos os compostos a 5 µg/mL.

#### **2.2.9. Derivatização Química**

Tendo em conta que a molécula de metilona apresenta na sua estrutura grupos funcionais, verificou-se em experiências prévias a necessidade de derivatizar os compostos em estudo, com vista à melhoria da sua análise cromatográfica.

Os métodos de derivatização química mais usados na análise de drogas de abuso por GC-MS no SQTf são a sililação e a acilação, reações de derivatização frequentemente utilizadas para as aminas primárias e secundárias. No âmbito do trabalho em estudo, a derivatização química foi feita por sililação.

As fases orgânicas obtidas após a SPE eram evaporadas até à secura sob corrente de azoto a 45 °C durante 20 minutos, de modo a remover o excesso de solvente e a concentrar os analitos. De seguida eram então adicionados 65 µL de reagente derivatizante e as amostras eram colocadas em banho seco a 80 °C durante 25 minutos. Depois de arrefecer até à temperatura ambiente, as amostras eram transferidas para *vials* e uma alíquota de 2 µL era injetada no sistema cromatográfico.

Na otimização do método analítico foram testados dois agentes derivatizantes: o MBTFA e o MSTFA:TMCS (95:5, v/v); como reagente derivatizante a usar para a validação do método analítico foi escolhido o MSTFA:TMCS (95:5, v/v), uma vez que originava picos com forma mais adequada (inclusivamente para os compostos que não reagem).

#### **2.2.10. Extração em Fase Sólida**

A técnica usada na preparação das amostras biológicas foi a extração em fase sólida, abordada no tópico que se segue.

##### **2.2.10.1. Pré-Tratamento das Amostras Biológicas**

Tendo em conta que as amostras biológicas a analisar se encontravam armazenadas a -10 °C, o primeiro passo no processo laboratorial era descongelar as mesmas até atingirem a temperatura ambiente, através de movimentos de rotação e inversão. De seguida, era diluída uma alíquota de amostra biológica de 500 µL em 8 mL de uma solução de tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 6,0 ± 0,1). A esta mistura eram adicionados 25 µL da solução de padrão interno (ficando à concentração de 250 ng/mL), bem como uma quantidade específica da solução de trabalho, dependendo do passo do processo de validação. Esta diluição permitia reduzir a viscosidade da amostra e, através da adição do tampão fosfato, controlar o pH. É também de referir que o uso de 500 µL de amostra biológica se justifica pela necessidade de determinar inúmeros compostos numa só análise toxicológica, pela utilização de metodologias analíticas distintas e pela existência de amostras biológicas cujo volume é diminuto (normalmente menor que 10 mL). Procedia-se então à homogeneização durante 15 minutos, seguida de centrifugação a 3500 rpm, também durante 15 minutos. Esta centrifugação induzia a sedimentação dos interferentes sólidos, diminuindo o risco de obstrução dos poros do enchimento das colunas.

##### **2.2.10.2. Metodologia de Extração em Fase Sólida**

Foram previamente testados vários protocolos de SPE, sendo as condições finais (aquelas que originaram os melhores resultados em termos de área e forma de pico cromatográfico) de seguida apresentadas.

As amostras de sangue (500 µL) eram diluídas com 8 mL de tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 6,0 ± 0,1). Após homogeneização por movimentos de inversão/rotação e centrifugação (15 minutos a 3500 rpm), as amostras eram adicionadas às colunas de SPE previamente acondicionadas com 2 mL de metanol e 2 mL de água desionizada. Após a passagem completa das amostras, as colunas eram lavadas com 2 mL de água desionizada, 2 mL de HCl a 0,1 M e metanol. Para remover o excesso de água eram adicionados 2 mL de *n*-hexano e as colunas eram então secas sob vácuo. Os analitos eram eluídos com 2 mL da mistura diclorometano:isopropanol:amónia (78:20:2) e os extratos eram levados à secura sob corrente de azoto a 45

°C. Os extratos eram então derivatizados com 65 µL da mistura MSTFA:TMS (95:5) a 80 °C durante 25 minutos, sendo depois transferidos para *vials* que seriam colocados no amostrador automático, sendo injetados 2 µL no equipamento.

#### **2.2.11. Validação do Método de Ensaio para Análise de Catinonas por SPE/GC-MS**

Esta dissertação consistiu no desenvolvimento de um novo método analítico que visa determinar qualitativa e quantitativamente a presença de cinco catinonas em amostras biológicas através do método SPE/GC-MS. Tendo em conta que este método não é baseado num método de referência nem num método normalizado, antes de ser inserido na rotina laboratorial, o método tem de ser validado, de forma a garantir que é adequado ao propósito a que se destina e que os resultados são confiáveis. Para tal, é necessário avaliar diversos parâmetros, enunciados de seguida.

##### **2.2.11.1. Avaliação da Seletividade**

Para a avaliação da seletividade do método analítico, selecionaram-se aleatoriamente de uma sequência de 233 sangues cardíacos *post mortem* de cadáveres de indivíduos com mais de 60 anos quarenta amostras de sangue.

As quarenta amostras escolhidas foram então divididas em dez grupos, cada um contendo quatro amostras de sangue diferentes (2 mL de cada uma), constituindo-se assim dez *pools* de amostras de sangue. De seguida foram preparadas vinte amostras para analisar. As primeiras cinco amostras correspondiam a amostras brancas fortificadas com as catinonas em estudo, bem como com uma mistura de analgésicos opioides, anfetaminas, canabinóides e cocaína. O segundo conjunto de cinco amostras foi apenas fortificado com as catinonas em estudo. Por sua vez, as restantes dez amostras diziam respeito a amostras negativas, não tendo sido fortificadas com as ditas catinonas; as primeiras cinco foram apenas fortificadas com a mistura de analgésicos opioides, anfetaminas, canabinóides e cocaína, e o segundo conjunto não foi fortificado com nenhum composto.

A todas estas amostras foi adicionado o padrão interno e aplicou-se o método analítico otimizado.

##### **2.2.11.2. Gama de Trabalho**

Designa-se por gama de trabalho o intervalo de concentrações mínima e máxima esperadas para cada analito [51]. A definição de uma gama de trabalho evita extrapolações e é obrigatória na aplicação de um método analítico. A avaliação deste parâmetro foi realizada em simultâneo com a avaliação da linearidade.

### 2.2.11.3. Linearidade e Modelo de Calibração

No trabalho em causa partiu-se do pressuposto que se verificava heterocedasticidade dos dados analíticos, ou seja, que no estudo da linearidade não se verificava a homogeneidade das variâncias (o desvio-padrão do erro para a variável dependente não seria, assim, constante ao longo da gama de trabalho). Desta forma, utilizou-se o método dos mínimos quadrados ponderados (*Weighted Least Squares Regression*, WLSR) para harmonizar as discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos de calibração [89, 90] e de modo a obter menores desvios na quantificação, sendo que de entre os fatores de ponderação empíricos baseados na variável independente (x) ou dependente (y), escolheu-se como fator de ponderação  $\frac{1}{x^2}$ . Em relação aos critérios de aceitação das curvas de calibração, é de referir que os valores dos coeficientes de correlação linear (r) e de determinação ( $R^2$ ) deveriam ser superiores a 0,99.

Os valores de concentração foram estimados por interpolação da área cromatográfica relativa (razão entre a área do pico cromatográfico do analito e do padrão interno) na equação de regressão linear ponderada.

Como referido anteriormente, é recomendada a utilização de cinco a oito calibradores no estudo de funções lineares. Desta forma, numa primeira abordagem foram usados sete calibradores em quatro curvas de calibração, uma por analito, através da fortificação com os analitos em estudo de alíquotas de sangue branco (500 µL). Os calibradores foram uniformemente distribuídos ao longo da gama de trabalho, não efetuando réplicas, nas concentrações 25, 50, 200, 400, 600, 800 e 1000 ng/mL. A todas as alíquotas adicionaram-se 25 µL de padrão interno de concentração 5 µg/mL (ficando a uma concentração de 250 ng/mL de sangue) e aplicou-se o método analítico desenvolvido. No entanto, após um elevado número de análises decidiu excluir-se o calibrador a 1000 ng/mL, de modo a obter resultados mais lineares.

Prepararam-se assim quatro curvas de calibração (uma por composto), cada uma com seis pontos de calibração, a 25, 50, 200, 400, 600 e 800 ng/mL. Para tal, utilizaram-se 500 µL de sangue branco, fortificado com a mistura das cinco catinonas nas referidas concentrações, bem como com 250 ng/mL de padrão interno. A estas soluções foi aplicado o método analítico desenvolvido. Este procedimento foi repetido durante cinco dias, no período de um mês. Juntamente com cada curva de calibração, foram também preparadas e analisadas amostras controlo (em triplicado,  $n = 3$ ) contendo os compostos em estudo a três concentrações distintas, uma na gama baixa (50 ng/mL), uma na gama média (100 ng/mL) e uma na gama alta (500 ng/mL). Estas amostras foram preparadas por fortificação com soluções independentes dos analitos em estudo (diferentes daquelas usadas na preparação dos calibradores). Estas amostras serviram para validar a curva de calibração em cada dia de trabalho (uma vez que as concentrações calculadas pela curva de calibração teriam de situar-se num intervalo de  $\pm 15\%$  da concentração teórica), sendo também usadas para o cálculo da precisão intermédia ( $n = 15$ ).

#### **2.2.11.4. Limites de Detecção**

Para testar os limites de detecção, prepararam-se cinco replicados ( $n = 5$ ) de uma alíquota de sangue branco fortificados com os analitos em estudo nas concentrações de 5, 10, 15 e 25 ng/mL. Simultaneamente, preparou-se um controlo negativo (uma alíquota de sangue branco à qual não se adicionam os analitos em estudo) e uma amostra de 600 ng/mL para servir de controlo positivo. Adicionaram-se também 250 ng/mL de padrão interno a todas as amostras.

A estas amostras aplicou-se o método analítico validado. Os cromatogramas obtidos foram comparados e fez-se uma confirmação qualitativa usando como controlo positivo a amostra de 600 ng/mL.

Os limites de detecção corresponderam assim à menor concentração a que todos os replicados originaram valores de razão S/N superiores ou iguais a 3:1 e em que os analitos foram inequivocamente identificados de acordo com os critérios enunciados anteriormente.

#### **2.2.11.5. Limites de Quantificação**

O estudo dos limites de quantificação foi realizado em conjunto com o estudo da linearidade, tendo-se estimado que o LOQ de cada catinona seria o valor de concentração do calibrador mais baixo da curva de calibração, no qual foi possível identificar e quantificar o analito, confirmando-se os critérios de identificação, bem como o cumprimento dos critérios de precisão (coeficiente de variação inferior a 20%) e de exatidão (erro relativo dentro de um intervalo de  $\pm 20\%$  da concentração teórica).

#### **2.2.11.6. Estabilidade**

Durante a validação do método analítico, foram realizados vários estudos de estabilidade, tanto em função do tempo como em função da temperatura de armazenamento.

Em primeiro lugar, foram preparados três conjuntos de soluções controlo de alíquotas de 500  $\mu$ L de sangue branco, fortificadas com 50, 100 e 500 ng/mL da solução das cinco catinonas. O primeiro conjunto de soluções foi deixado à temperatura ambiente de um dia para o outro (cerca de 25 °C), tendo-se aplicado de seguida o método analítico. O segundo conjunto de soluções controlo foi deixado no frigorífico (a 6 °C) durante sete dias, tendo sido de seguida aplicado o método analítico. Por outro lado, o terceiro conjunto de soluções controlo foi deixado no congelador (a - 10 °C) durante sete dias, tendo sido descongelado e voltado a congelar ao segundo e ao terceiro dias.

Por outro lado, fez-se também outro tipo de estudo da estabilidade. Uma semana depois de se injetarem em GC-MS os controlos do primeiro dia do estudo da linearidade, voltaram a injetar-se os mesmos *vials*. Por fim, foram feitos dois conjuntos de amostras controlo, sendo que um desses conjuntos ficou no congelador até a sua análise e o outro foi descongelado e voltado a congelar inúmeras vezes até o dia da extração, que se deu três meses depois.

Foi então possível calcular a percentagem de degradação dos compostos nas várias concentrações estudadas, através da Equação 2.1.

$$\text{Degradação (\%)} = 100 - \left[ \sum_{i=3}^{n=3} \left( \frac{\text{Concentração Experimental Ensaio } n \times 100}{\text{Concentração Teórica}} \right) \right] \div 3 \quad (2.1)$$

Estes testes permitiram concluir a ordem de estabilidade destes compostos.

#### **2.2.11.7. Precisão: Repetibilidade, Reprodutibilidade e Precisão Intermédia**

O estudo destes parâmetros foi feito em simultâneo com a avaliação da linearidade e da gama de trabalho, ao longo de cinco dias de trabalho.

A repetibilidade foi estimada para cada catinona através de cinco amostras de igual concentração que foram analisadas a cada dia, tendo sido estudados para este efeito as concentrações de 25, 50, 200, 400 e 800 ng/mL. Para tal, foi calculado o coeficiente de variação, expresso em percentagem e definido como a razão do desvio-padrão (*standard deviation*, ST) em relação ao valor médio ( $\bar{X}$ ), como indica a Equação 2.2.

Para o estudo da reprodutibilidade, foram estudados os calibradores, que seriam repetidos cinco vezes, a cada dia da validação, variando-se desta forma o dia da análise a cada vez, tendo-se por sua vez calculado também o coeficiente de variação, segundo a Equação 2.2.

$$CV = \frac{ST}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.2)$$

As soluções preparadas a cada dia foram analisadas em condições de repetibilidade, mas de forma independente. Foram adicionados alguns fatores de variabilidade, nomeadamente a mudança de lotes de reagentes, diferentes soluções de reagentes, a mudança de colunas de extração e de colunas cromatográficas, diferentes amostras de sangue branco e diferentes curvas de calibração.

Na análise da precisão intermédia (SI) foram analisadas três concentrações em triplicado, a 50, 100 e 500 ng/mL, em todos os cinco dias do estudo da linearidade do método. Para cada analito, e em cada concentração, foram determinadas as estimativas da variância da repetibilidade ( $S_R^2$ ) e da precisão intermédia ( $S_I^2$ ) pela análise de variância (ANOVA, Tabela 2.2), através das equações apresentadas na Tabela 2.3 [63, 91, 92].

**Tabela 2.2: Análise de variância (tabela ANOVA) para o modelo experimental usado no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia.**

Fonte de Variação	Somas dos Quadrados (SS)	Graus de Liberdade	Quadrados Médios (MS)
Inter Grupos ( <i>run</i> )	$SS_{run} = n \sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2$	$p - 1$	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2}{p - 1}$
Intra Grupos (residual)	$SS_r = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_i)^2$	$p(p - 1)$	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{p(p - 1)}$
Total	$SS_T$	$pn - 1$	$MS_r = \frac{SS_T}{n - 1}$

**Tabela 2.3: Cálculo das estimativas das variâncias para o modelo experimental utilizado no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia.**

Variância	Expressão	Graus de Liberdade
Variância da Repetibilidade ( $S_R^2$ )	$S_R^2 = MS_r$	$p(p - 1)$
Variância <i>Between-run</i> ( $S_{run}^2$ )	$S_{run}^2 = \frac{MS_{run} - MS_r}{n}$	$p(p - 1)$
Variância da Precisão Intermédia ( $S_I^2$ )	$S_I^2 = (S_R^2) + (S_{run}^2)$	$p(p - 1)$
Variância da Média ( $S_X^2$ )	$S_X^2 = \frac{MS_{run}}{n}$	$p - 1$

Nas Tabelas 2.2 e 2.3,  $p$  representa o número de sequências analíticas (*run*) nas quais a amostra é analisada,  $n$  representa o número de replicados efetuados em cada sequência analítica,  $X_{ij}$  representa um resultado individual de uma amostra analisada no  $j$ -iésimo replicado e na  $i$ -ésima sequência,  $\bar{X}_i$  é a média de  $j$  replicados obtidos na sequência  $i$ , e  $\bar{\bar{X}}$  exprime a grande média, calculada como a média das médias dos resultados obtidos em  $p$  sequências diferentes.

#### 2.2.11.8. Exatidão

À falta de materiais de referência certificados, na impossibilidade de participar em ensaios interlaboratoriais, e devido à inexistência de um método de referência, o estudo da exatidão foi feito através da razão entre o valor experimental e o valor esperado (recuperação relativa) [63, 65].

Assim, o estudo deste parâmetro foi realizado em simultâneo com o estudo da linearidade, durante os cinco dias em que este decorreu. Desta forma, sendo as amostras a analisar fortificadas com os analitos, esta metodologia apresenta a desvantagem de que a estimativa da recuperação poderá ser diferente da que seria obtida no caso de se trabalhar com uma amostra real positiva.

A exatidão foi, assim, expressa em percentagem, como o erro relativo (ER) da concentração estimada para cada nível de concentração, tendo sido calculada segundo a Equação 2.3 [93].

$$ER = \frac{\text{concentração experimental} - \text{valor teórico}}{\text{valor teórico}} \times 100 \quad (2.3)$$

É de referir que o valor de ER deve ser de  $\pm 15\%$  do valor teórico (ou  $\pm 20\%$  no limite de quantificação) [91].

#### **2.2.11.9. Recuperação da Fase de Extração (Eficiência da Extração)**

Para avaliar este parâmetro, foram selecionadas três gamas de trabalho (a 50, 100 e 500 ng/mL) e extraíram-se dois conjuntos de alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de sangue branco, em triplicado, para cada uma das concentrações. A estas soluções foi aplicado o método analítico, sendo que o primeiro conjunto de nove soluções foi fortificado antes da extração por SPE, e as restantes nove foram fortificadas logo a seguir à extração, imediatamente antes da evaporação. É de notar que o padrão interno foi adicionado depois da extração em todos as soluções, também antes da evaporação, numa concentração de 250 ng/mL.

Os resultados analíticos foram avaliados mediante o cálculo da recuperação, segundo a Equação 2.4, em que os valores do numerador dizem respeito aos valores obtidos com as soluções que foram fortificadas antes da extração, e os valores do denominador com as que foram fortificadas depois da extração. As áreas relativas obtiveram-se dividindo as áreas dos analitos pelas áreas do padrão interno.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Área Relativa (amostras fortificadas antes da extração)}}{\text{Área Relativa (amostras fortificadas depois da extração)}} \times 100 \quad (2.4)$$

#### **2.2.11.10. Robustez**

A robustez do método foi estudada em condições de precisão intermédia no estudo da precisão e da exatidão, em simultâneo com a avaliação da linearidade.

#### **2.2.11.11. Avaliação do Fenómeno de Arrastamento (*Carryover*)**

A avaliação deste parâmetro foi feita por análise de uma amostra em branco injetada após o calibrador mais concentrado. Assim, essa alíquota não foi fortificada com os analitos, mas foi sujeita às mesmas condições analíticas das amostras fortificadas.



#### **2.2.12. Análise de Amostras Reais**

Após validação do método analítico, foram selecionadas 14 amostras de sangue que tinham sido consideradas positivas para anfetaminas, de modo a avaliar se as catinonas em estudo poderiam ser agora detetadas nas mesmas amostras.

#### **2.2.13. Aplicação do Procedimento de Extração a Amostras de Urina**

O método analítico desenvolvido e validado para amostras de sangue foi aplicado a amostras de urina, uma vez que muitas das vezes são colhidas estas amostras a nível hospitalar quando se suspeita da presença de NSP.

### 3. Apresentação e Discussão dos Resultados

No presente capítulo serão apresentados detalhadamente os resultados obtidos ao longo da validação do método analítico.

#### 3.1. Identificação dos Compostos

Para a identificação das substâncias é necessário selecionar três fragmentos diagnóstico, determinar o tempo de retenção e as respectivas razões de áreas, razão pela qual foram feitos em primeiro lugar os esquemas de fragmentação previstos por EI para cada uma das cinco catinonas [39]. Os compostos em estudo foram então analisados por GC-MS em modo *full scan*, de modo a selecionar os três fragmentos iônicos diagnóstico característicos de cada composto, que serão usados de seguida em modo SIM, aumentando desta forma a sensibilidade e a seletividade da análise por GC-MS (Anexo C, Figuras 6.64 a 6.68).

Para tal, as amostras foram injetadas numa concentração de 1 mg/mL com e sem agente derivatizante e com dois tipos de padrão interno, que permitiram selecionar como melhores condições de trabalho o uso do reagente de derivatização MSTFA:TMCS (95:5, v/v) e como padrão interno a cocaína- $d_3$ , como se discutirá mais à frente.

Na Tabela 3.1 encontram-se os fragmentos iônicos diagnóstico monitorizados em modo SIM e os seus respetivos tempos de retenção, obtidos mediante análise por GC-MS após silição com MSTFA:TMCS (95:5, v/v). Encontram-se também apresentados os tempos de retenção e os fragmentos iônicos dos compostos usados como padrão interno.

**Tabela 3.1: Razão massa/carga dos fragmentos iônicos dos iões diagnóstico monitorizados em modo SIM e tempos de retenção usados na identificação dos compostos derivatizados com MSTFA:TMCS (95:5, v/v). Os fragmentos usados na análise quantitativa encontram-se assinalados a negrito.**

Composto	Tempo de Retenção (min)	Fragmentos Iônicos ( $m/z$ )
4-CEC	8,10	<b>72</b> , 111, 139
$\alpha$ -PVP	9,31	<b>126</b> , 105, 77
4-Cl-PVP	10,22	<b>126</b> , 111, 139
MDPV	11,20	<b>126</b> , 149, 121
Benzoilecognina- $d_3$	11,88	<b>243</b>
Cocaína- $d_3$	11,58	<b>185</b>

No entanto, em modo SIM e a concentrações mais baixas, os espectros de massa da molécula de metilona apresentaram fragmentos iônicos pouco abundantes que resultaram na consequente baixa sensibilidade, impossibilitando a identificação da mesma (como é possível verificar no Anexo C, Figura 6.69, em que é evidente a baixa sensibilidade dos cromatogramas obtidos em modo SIM da molécula de metilona). Desta forma, decidiu-se excluir a metilona do processo de validação, passando apenas as restantes quatro moléculas a ser o objeto de estudo desta dissertação.

A título de exemplo, a Tabela 3.2 apresenta os resultados obtidos na fortificação com a mistura das catinonas (25 ng/mL) de uma amostra branca de sangue total, para a molécula de MDPV. Na Figura 6.70 do Anexo C encontram-se exemplos das folhas de cálculo usadas na rotina do SQTF para as quatro moléculas em estudo. Esta amostra foi processada e analisada por SPE/GC-MS, com derivatização com MSTFA:TMCS (95:5, v/v).

**Tabela 3.2: Identificação da MDPV numa amostra branca de sangue total fortificada com 25 ng/mL da mistura das cinco catinonas em estudo, à qual se adicionaram 250 ng/mL de padrão interno.**

Controlo	Fragmentos Iónicos	Área Absoluta	Área Relativa	S/N	$t_R$ (MDPV)	$t_R$ (IS)	$t_{Rf}$
800 ng/mL	$m/z$ 126	3297334	100.0%	> 3	11.20	11.58	0.97
	$m/z$ 149	196702	6.0%				
	$m/z$ 121	185040	5.6%				
Amostra	Fragmentos Iónicos	Área Absoluta	Área Relativa	S/N	$t_R$ (MDPV)	$t_R$ (IS)	$t_{Rf}$
25 ng/mL	$m/z$ 126	114245	100.0%	> 3	11.20	11.58	0.97
	$m/z$ 149	12496	10.9%				
	$m/z$ 121	9306	8.1%				

### 3.2. Otimização do Método Analítico

Numa primeira fase, foi necessário efetuar diversas análises de modo a escolher o método que mais se adequava às análises em estudo. Para tal, foi numa primeira fase escolhido o padrão interno e o agente derivatizante a usar aquando do processo analítico. De seguida, foram testados vários métodos de extração por SPE de modo a verificar qual o mais adequado ao propósito do trabalho em questão, bem como selecionados seis dos sete calibradores inicialmente analisados.

### 3.3. Escolha do Padrão Interno

Com vista a escolher o padrão interno mais adequado às análises em estudo, de modo a que se pudessem aplicar os critérios de aceitação para a identificação inequívoca das catinonas nas amostras biológicas, foi usada uma solução de padrão interno que consistiu numa mistura de benzoilecgonina- $d_3$  e cocaína- $d_3$  em acetonitrilo e de concentração 5 µg/mL. Esta solução foi testada apenas com o intuito de verificar se o uso de cocaína- $d_3$  originaria melhores resultados analíticos que a benzoilecgonina- $d_3$ , o que de facto se verificou. Como é possível observar através da Figura 6.71 do Anexo D, o uso da cocaína- $d_3$  como padrão interno originou resultados mais lineares, o que poderá dever-se em parte ao facto de que esta não reage com o reagente de derivatização, à semelhança das catinonas em estudo (e ao contrário do que acontece com a benzoilecgonina- $d_3$ ).

### 3.4. Derivatização Química

A derivatização é uma reação química em que um grupo polar de uma molécula é quimicamente convertido num grupo não polar para tornar a molécula volátil de forma a ser analisada por GC-MS [94]. Além disso, este processo pode melhorar a resolução de compostos que eluem no mesmo tempo de retenção e picos sobrepostos, aumentando assim a sensibilidade, a seletividade e a resolução [95].

Um bom reagente de derivatização deve originar uma reação reprodutível, ser eficiente e seguro. Para GC, existem três tipos básicos de reações de derivatização: a sililação, a acilação e a alquilação. Os reagentes de sililação reagem com compostos que contêm hidrogénios ativos e são os mais usados em GC. Os reagentes de acilação reagem com grupos funcionais altamente polares, como aminoácidos ou hidratos de carbono. Por sua vez, os reagentes alquilantes direcionam hidrogénios ativos em aminas e grupos hidroxilo. Podem também ser usados múltiplos reagentes de derivatização em compostos que contenham grupos funcionais diferentes [95].

De modo a verificar se o processo de derivatização seria necessário na validação do método analítico, foram realizadas análises às substâncias em estudo com e sem agente derivatizante. Apenas a molécula de metilona apresentava um espectro de massa diferente quando derivatizada, razão pela qual se decidiu realizar o processo com derivatização. Em teoria, a molécula de 4-CEC deveria também ser derivatizada, mas devido ao impedimento estereoquímico presente no átomo de azoto do grupo amina, tal não se verificou. Assim, no trabalho desenvolvido foram testados dois reagentes diferentes, que correspondem também a dois tipos diferentes de derivatização. Começou-se por testar o uso de MBTFA que reage através de uma reação de acilação, tendo-se de seguida usado o MSTFA:TMCS (95:5, v/v) numa reação de sililação. Através da análise do cromatograma da Figura 6.72 do Anexo E, é possível verificar que, aquando do uso de MBTFA, entre os 9 e os 10 minutos deteta-se a presença de interferentes, impossibilitando a identificação inequívoca da molécula de metilona. Por sua vez, a Figura 6.73 do Anexo E ilustra o cromatograma e o espectro de massa obtidos usando como reagente de derivatização o MSTFA:TMCS (95:5, v/v), permitindo a análise inequívoca da molécula de metilona.

Como referido anteriormente, acabou por ser excluir a metilona da validação do método analítico. No entanto, e mesmo sendo a metilona a única que necessitava de derivatização, continuou a realizar-se este processo tendo em conta que se verificou que os picos cromatográficos apresentavam melhorias consideráveis na sua forma após o processo de derivatização, e tendo em conta que o equipamento GC-MS que se estava a usar era apenas usado para amostras derivatizadas e, em experiências prévias, demonstrou ser o aparelho mais adequado para o estudo em causa.

### 3.5. Metodologia de Extração em Fase Sólida

De modo a proceder à otimização do procedimento de extração e determinar qual a melhor metodologia, foram testadas as colunas Oasis<sup>®</sup> HLB e Oasis<sup>®</sup> MCX, bem como diferentes reagentes ao longo do processo, de acordo com a Tabela 3.3.

**Tabela 3.3: Diferentes tipos de metodologia de SPE testados na otimização do método analítico (os reagentes de lavagem encontram-se sublinhados).**

Amostra	Tipo de Coluna	Metodologia de Extração
Branco	Oasis <sup>®</sup> MCX	2 mL de metanol; 2 mL de água desionizada; amostra; 2 mL de água desionizada; 2 mL de HCl 0,1 M; <u>2 mL de diclorometano:metanol (70:30, v/v)</u> ; 2 mL de <i>n</i> -hexano; secagem; 2 mL de diclorometano:isopropanol:amónia (78:20:2, v/v/v)
1, 2	Oasis <sup>®</sup> MCX	2 mL de metanol; 2 mL de água desionizada; amostra; 2 mL de água desionizada; 2 mL de HCl 0,1 M; <u>2 mL de metanol</u> ; 2 mL de <i>n</i> -hexano; secagem; 2 mL de diclorometano:isopropanol:amónia (78:20:2, v/v/v)
3, 4	Oasis <sup>®</sup> MCX	2 mL de metanol; 2 mL de água desionizada; amostra; 2 mL de água desionizada; 2 mL de HCl 0,1 M; <u>2 mL de isopropanol</u> ; 2 mL de <i>n</i> -hexano; secagem; 2 mL de diclorometano:isopropanol:amónia (78:20:2, v/v/v)
5, 6	Oasis <sup>®</sup> HLB	2 mL de metanol; 2 mL de água desionizada; amostra; <u>2 mL de metanol a 5%</u> ; secagem; 2 mL de diclorometano:isopropanol (75:25, v/v)
7, 8	Oasis <sup>®</sup> HLB	2 mL de metanol; 2 mL de água desionizada; amostra; <u>2 mL de metanol a 10%</u> ; secagem; 2 mL de diclorometano:isopropanol (75:25, v/v)
9, 10	Oasis <sup>®</sup> HLB	2 mL de metanol; 2 mL de água desionizada; amostra; <u>2 mL de isopropanol a 5%</u> ; secagem; 2 mL de diclorometano:isopropanol (75:25, v/v)
11, 12	Oasis <sup>®</sup> HLB	2 mL de metanol; 2 mL de água desionizada; amostra; <u>2 mL de isopropanol a 10%</u> ; secagem; 2 mL de diclorometano:isopropanol (75:25, v/v)

As experiências realizadas com o auxílio de colunas Oasis<sup>®</sup> HLB não originaram bons resultados, como é possível observar na Figura 6.74 do Anexo F, tendo-se verificado em todas as amostras a ausência da 4-CEC e picos menos intensos para as restantes catinonas.

Por outro lado, todos os resultados obtidos com as colunas Oasis<sup>®</sup> MCX foram favoráveis, como ilustra a Figura 6.75 do Anexo F, tendo-se acabado por usar como reagente de lavagem o metanol, única e exclusivamente por ter um custo menos elevado.

Estes resultados estão de acordo com o esperado, tendo em conta que as primeiras colunas possibilitam a retenção de analitos de uma vasta gama de polaridades por um mecanismo de fase reversa e as segundas possibilitam um mecanismo extrativo misto (fase reversa e troca iónica), estando descrito ser eficiente para analitos básicos. Desta forma, e visto que as colunas Oasis<sup>®</sup> MCX possuem grupos sulfónicos no polímero e detêm fase estacionária de modo misto, troca iónica e fase reversa, há um favorecimento da retenção das catinonas em estudo devido à presença do grupo amina nas mesmas [96].

Além disso, é de salientar que as amostras de sangue total foram numa primeira fase diluídas em 8 mL de solução de tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 6,0 ± 0,1), o que possibilita controlar o pH da amostra biológica, sendo que as catinonas em estudo apresentam características básicas e possuem grupos funcionais

ionizáveis (grupos amina). Desta forma, os compostos ionizados originam espécies catiónicas, o que leva a um aumento da adsorção dos compostos básicos por interações eletrostáticas com os grupos aniônicos.

Analisada a escolha da fase estacionária, é de referir a lavagem da mesma, que visa remover os interferentes da matriz e é neste caso feita com água desionizada seguida de HCl 0,1 M, metanol e *n*-hexano. O HCl 0,1 M permite a eluição de outros componentes da matriz que não ficam retidos na fase estacionária e o *n*-hexano é usado para eliminar interferentes hidrofóbicos, gorduras e vestígios de água. Depois de seca a coluna, os analitos são eluídos com uma solução de diclorometano:isopropanol:amónia (78:20:2, v/v/v), que permite a recuperação dos compostos.

### **3.6. Validação do Método Analítico de Ensaio para Análise de Catinonas por SPE/GC-MS**

Como referido anteriormente, a avaliação de qualquer método analítico, seja ele qualitativo ou quantitativo, deve compreender um conjunto de etapas específicas. Este capítulo abordará essas mesmas etapas.

#### **3.6.1. Avaliação da Seletividade**

Tendo em conta que não se encontra descrita na literatura uma metodologia específica para o estudo da seletividade de um método analítico [51], a avaliação deste parâmetro foi realizada de modo a avaliar as interferências da matriz, comprovando a ausência de potenciais sinais analíticos que pudessem interferir com os sinais dos compostos em estudo em amostras brancas. Para além disso, foram também fortificadas amostras brancas (positivas e negativas) com outros compostos passíveis de ser encontrados na rotina do SQTF, nomeadamente analgésicos opioides, anfetaminas, canabinóides e cocaína.

Desta forma, e como referido anteriormente, selecionaram-se aleatoriamente de uma sequência de 233 sangues cardíacos *post mortem* de cadáveres de indivíduos com mais de 60 anos quarenta amostras de sangue, que foram então divididas em dez grupos, cada um contendo quatro amostras de sangue diferentes (2 mL de cada uma), constituindo-se assim dez *pools* de amostras de sangue. Foram escolhidas estas amostras pois seriam provavelmente isentas dos analitos em estudo, tendo em conta a faixa etária em causa. É de notar que a utilização de *pools* se considera vantajosa tendo em conta que fornece heterogeneidade às amostras analisadas, o que permite um estudo mais aprofundado da seletividade do método. De seguida foram preparadas vinte amostras para analisar, de acordo com o enunciado na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4: Amostras analisadas no estudo da seletividade.**

Amostras a Analisar	Conteúdo
1 a 5	8 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 500 µL de alíquota 1 a 5 (respetivamente) + 25 µL de padrão interno (benzoilecognina- <i>d</i> <sub>3</sub> ) + 50 µL de mistura das 5 catinonas (5 µL/mL) + 25 µL de mistura de analgésicos opioides (10 µg/mL) + 25 µL de mistura de anfetaminas (10 µg/mL) + 25 µL de mistura de canabinóides (10 µg/mL) + 25 µL de cocaína e metabolitos (10 µg/mL)
6 a 10	8 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 500 µL de alíquota 6 a 10 (respetivamente) + 25 µL de padrão interno (benzoilecognina- <i>d</i> <sub>3</sub> ) + 50 µL de mistura das 5 catinonas (5 µL/mL)
1b – 5b	8 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 500 µL de alíquota 1 a 5 (respetivamente) + 25 µL de padrão interno (benzoilecognina- <i>d</i> <sub>3</sub> ) + 25 µL de mistura de analgésicos opioides (10 µg/mL) + 25 µL de mistura de anfetaminas (10 µg/mL) + 25 µL de mistura de canabinóides (10 µg/mL) + 25 µL de cocaína e metabolitos (10 µg/mL)
6b – 10b	8 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 500 µL de alíquota 6 a 10 (respetivamente) + 25 µL de padrão interno (benzoilecognina- <i>d</i> <sub>3</sub> )

Depois de aplicado o método analítico otimizado, foram analisados os resultados por GC-MS. Estes resultados permitiram verificar que apenas se obtiveram resultados negativos para as amostras que não foram fortificadas com catinonas (1b-10b) e resultados positivos para amostras que foram fortificadas com catinonas (1-10). Assim, tendo em conta que num método de confirmação qualitativa o SQTF exige uma percentagem de falsos positivos de 0% e de falsos negativos igual ou inferior a 10%, é possível afirmar que o método em causa é seletivo.

Por outro lado, e mesmo sendo difícil evitar a presença de substâncias interferentes em amostras biológicas complexas como o sangue, não foram encontrados interferentes da matriz biológica que pudessem interferir com os sinais cromatográficos das catinonas em estudo, tendo-se dado a confirmação inequívoca da presença dos analitos nas alíquotas positivas, através da confirmação da presença dos três iões de diagnóstico e no tempo de retenção esperado para o analito.

Quanto aos interferentes adicionados às alíquotas, é de referir que a presença de um interferente não é aceitável quando afeta a identificação e/ou exatidão da quantificação dos analitos em estudo [97, 98]. Porém, para as catinonas  $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP e MDPV isto não foi verificado, razão pela qual a identificação dessas catinonas não é prejudicada pela presença de outras amostras analisadas frequentemente na rotina do SQTF (de notar que a composição das amostras analisadas se encontra na Tabela 3.5). Este fator é importante tendo em conta o fenómeno de policonsumo, sendo que a metodologia validada poderá assim determinar simultaneamente várias drogas de abuso. No entanto, no que diz respeito à 4-CEC verificou-se não ser possível identificá-la aquando da presença dos outros compostos presentes na solução, como é possível verificar através da análise da Figura 6.76 do Anexo G. Deste modo, a identificação desta catinona poderia estar comprometida em amostras positivas para outros tipos de compostos. No entanto, a probabilidade de existirem amostras reais positivas para tantos compostos diferentes é bastante pequena, pelo que esta aparente ausência de especificidade não constitui um verdadeiro problema.

**Tabela 3.5: Composição das amostras de anfetaminas, analgésicos opioides, canabinóides e cocaína analisadas no estudo da seletividade.**

Amostra	Composição
Analgésicos Opioides 10 µg/mL	Morfina; Codeína
Anfetaminas 10 mg/mL	Anfetamina; Metanfetamina; MBDB; MDMA; MDA; MDEA
Canabinóides 10 µg/mL	THC; 11-OH-THC; THCCOOH
Cocaína e Metabólitos 10 µg/mL	Cocaína; Benzoilecognina; EME; Cocaetileno; Ketamina; Levamisol; Atropina; Norcocaína

### 3.6.2. Linearidade e Modelo de Calibração

Como referido anteriormente, foi aplicado o modelo de regressão linear ponderada, estando os resultados obtidos resumidos na Tabela 3.6 (Tabela 6.1 do Anexo H).

**Tabela 3.6: Resumo dos resultados obtidos pelo método de regressão linear para as cationonas em estudo.**

Cationona	Ião ( <i>m/z</i> )	Interseção	Declive	r	R <sup>2</sup>
4-CEC	72	- 0,0330	0,0051	0,9980	0,9959
α-PVP	126	0,0097	0,0090	0,9985	0,9970
4-Cl-PVP	126	0,0213	0,0085	0,9980	0,9961
MDPV	126	0,0017	0,0076	0,9987	0,9975

Tendo em conta os critérios de aceitação da linearidade enunciados no capítulo anterior, é possível comprovar a linearidade do método no intervalo de 25 a 800 ng/mL estabelecido para as quatro cationonas, visto que os valores dos coeficientes de correlação e de determinação são superiores a 0,99 em todos os casos.

A título de exemplo, na Figura 6.77 do Anexo H é possível observar-se uma curva de calibração com uma gama de trabalho de 25 a 1000 ng/mL, em comparação com uma curva de calibração que contém apenas os calibradores acima enunciados. Verifica-se assim que os resultados mais lineares resultam da exclusão do calibrador a 1000 ng/mL.

### 3.6.3. Limites de Detecção

Através da comparação com uma amostra fortificada de concentração 600 ng/mL, foi possível verificar se seria possível dar-se uma confirmação qualitativa das cationonas em estudo nas concentrações de 5, 10, 15 e 25 ng/mL. Através da Figura 6.78 do Anexo I, é possível verificar-se a presença cromatográfica dos analitos em estudo para estas concentrações, com exceção da molécula de 4-CEC. Desta forma, não tendo sido possível efetuar uma deteção desta substância a tão baixas concentrações, e sabendo do estudo da linearidade que é possível detetá-la (e quantificá-la) a 25 ng/mL, foi possível concluir que o LOD da 4-CEC seria essa



mesma concentração. Desta forma, conclui-se que o LOD para as catinonas  $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP e MDPV seria de 5 ng/mL (como se encontra indicado nas folhas de cálculo apresentadas na Figura 6.79 do Anexo I), enquanto que o LOD da 4-CEC seria de 25 ng/mL.

O único resultado encontrado na bibliografia que é passível de ser diretamente comparado com os LOD obtidos (ou seja, que utiliza a metodologia SPE/GC-MS em amostras de sangue total) aborda a catinona MDPV, estabelecendo um LOD de 10 ng/mL [24]. Desta forma, sendo o LOD obtido neste trabalho experimental de 5 ng/mL, o método analítico validado constitui uma vantagem e uma mais-valia em termos de sensibilidade.

Por outro lado, outros trabalhos podem ser analisados, mas tendo em conta matrizes biológicas, métodos de extração, métodos cromatográficos e/ou reagentes de derivatização diferentes. É possível encontrar na literatura (para as moléculas de  $\alpha$ -PVP e MDPV) LOD da ordem dos 0,5 ng/mL [22], 1 ng/mL [9] e 2 ng/mL [31]. Porém, estes valores dizem respeito a métodos com recurso às técnicas de LC-HRMS [9] ou LC-Q/TOF [31], que por utilizarem espectrometria de massa em *tandem* permitem maiores sensibilidade e seletividade. O resultado de 0,5 ng/mL foi obtido através de um método validado para SPE/GC-MS mas em urina [22], que normalmente origina cromatogramas mais limpos.

#### **3.6.4. Limites de Quantificação**

Os valores de LOQ corresponderam à concentração do calibrador mais baixo utilizado no estudo da linearidade (ver secção 3.6.2), no qual foi possível confirmar a presença dos analitos de acordo com os critérios de identificação da WADA e com uma precisão e exatidão adequadas. Nas Tabelas 3.8 a 3.10 (secção 3.6.6.) estão expressas a precisão e a exatidão do método para cada catinona, através da análise dos valores de CV e de ER. Tendo em conta que os valores de CV foram menores ou iguais que 20% para o calibrador de menor concentração, e que o ER foi de  $\pm 20\%$ , foi possível determinar o limite de quantificação por este método.

Desta forma, os valores de LOQ para todos os analitos foram de 25 ng/mL.

#### **3.6.5. Estabilidade**

O estudo da estabilidade dos analitos foi feito por várias etapas. A Tabela 3.7 apresenta os valores de degradação dos analitos aquando da realização destes testes. Encontram-se destacados os valores que não foram possíveis avaliar, dizendo respeito a todos os valores obtidos através de retas de calibração com coeficientes de determinação abaixo de 0,99.

Numa primeira fase, foram preparados três conjuntos de soluções controlo de sangue branco fortificadas com 50, 100 e 500 ng/mL da solução de trabalho (em triplicado), correspondendo a gama baixa, média e alta.

Depois de fortificado com os analitos em estudo, o primeiro conjunto de soluções foi deixado à temperatura ambiente durante a noite, tendo-se aplicado no dia seguinte o método analítico otimizado. Através da análise da Figura 6.80 do Anexo J, é possível verificar que os resultados cromatográficos mostraram alguma degradação das catinonas 4-CEC e 4-Cl-PVP e uma mínima degradação da  $\alpha$ -PVP e da MDPV. Tendo em conta que os resultados nesta gama de concentrações têm um CV da ordem dos 15%, não se poderá falar em degradação se esta for dessa ordem. Deste modo, não se considera que a  $\alpha$ -PVP e a MDPV se degradem à temperatura ambiente de um dia para o outro, mas não se pode dizer o mesmo para as restantes catinonas. O segundo conjunto de soluções controlo foi deixado no frigorífico durante sete dias, tendo sido de seguida aplicado o método analítico. O terceiro conjunto de soluções controlo foi deixado no congelador durante sete dias, tendo sido descongeladas e voltadas a congelar ao segundo e ao terceiro dias. Por outro lado, uma semana depois de se injetarem em GC-MS os controlos do primeiro dia de validação, voltaram a injetar-se esses controlos. Porém, estas amostras foram extraídas (ou, no terceiro caso, injetadas) num dos dias do estudo da linearidade, e nesse mesmo dia não se obtiveram resultados analíticos favoráveis, obtendo-se coeficientes de determinação tão baixos quanto 0,7665. Apenas a molécula de MDPV originou bons resultados analíticos, razão pela qual é a única passível de ser analisada. Tendo em conta os valores de degradação, não se pode considerar que a MDPV se degrade quando armazenada no frigorífico nem no congelador durante os períodos referidos. Porém, depois de se obter o extrato resultante do processo de extração e derivatização, a MDPV tende a degradar.

Por fim, foram preparados dois conjuntos de substâncias controlo, sendo que um desses conjuntos ficou no congelador até a sua análise (Figura 6.81 do Anexo J), e o outro foi descongelado e voltado a congelar inúmeras vezes até o dia da extração, que se deu três meses depois (Figura 6.82 do Anexo J). Os resultados mostram uma degradação quase completa da molécula de 4-Cl-PVP nos dois casos, e uma degradação considerável da  $\alpha$ -PVP e da MDPV. Foi impossível calcular a degradação da molécula de 4-CEC pois os picos obtidos eram muito pouco abundantes, não sendo possível sequer integrá-los. É assim possível concluir que as moléculas não são estáveis quando armazenadas na matriz biológica por um longo período de tempo. Tendo em conta os resultados, pode-se também afirmar que descongelar e voltar a congelar as amostras não provoca degradação adicional dos analitos.

Estes testes permitiram concluir a ordem de estabilidade destes compostos, sendo assim a 4-CEC a catinona menos estável, seguida da 4-Cl-PVP, da  $\alpha$ -PVP e, por fim, da MDPV, que mostrou desta forma ser a catinona mais estável.

**Tabela 3.7: Degradação dos analitos em estudo no estudo da estabilidade. Os resultados desprezados encontram-se destacados com as linhas a cinzento.**

Temperatura Ambiente de um Dia para o Outro				Frigorífico Durante Sete Dias			
Catinona	Degradação (%)			Catinona	Degradação (%)		
	50 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL		50 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
4-CEC	13,71	52,48	38,45	4-CEC	-21,95	-9,71	4,07
$\alpha$ -PVP	15,77	8,83	18,17	$\alpha$ -PVP	- 1,55	-0,27	9,97
4-Cl-PVP	58,86	53,37	55,48	4-Cl-PVP	59,42	70,97	80,53
MDPV	9,76	6,01	9,09	MDPV	11,28	7,98	14,47

Congelador Durante Sete Dias (Descongelado)				Reinjeção de <i>Vials</i> Após Uma Semana			
Catinona	Degradação (%)			Catinona	Degradação (%)		
	50 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL		50 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
4-CEC	-51,97	-54,12	-40,20	4-CEC	-33,84	-17,86	-23,54
$\alpha$ -PVP	-20,67	-16,42	4,35	$\alpha$ -PVP	-18,59	-7,23	-5,34
4-Cl-PVP	11,69	23,83	37,14	4-Cl-PVP	-20,84	-10,23	1,95
MDPV	6,71	5,17	13,48	MDPV	8,49	15,07	28,27

Congelador Durante Três Meses (Descongelado)				Congelador Durante Três Meses			
Catinona	Degradação (%)			Catinona	Degradação (%)		
	50 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL		50 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
4-CEC	-	-	-	4-CEC	-	-	-
$\alpha$ -PVP	70,63	66,01	70,41	$\alpha$ -PVP	64,90	53,23	61,48
4-Cl-PVP	96,69	97,82	98,86	4-Cl-PVP	97,09	98,45	99,23
MDPV	30,01	28,06	35,74	MDPV	28,31	26,59	37,38

É de salientar que os valores apresentados acima foram calculados através da Equação 2.1.

### 3.6.6. Precisão (Repetibilidade, Reprodutibilidade e Precisão Intermédia) e Exatidão

Os resultados referentes à precisão e à exatidão encontram-se sumarizados nas Tabelas 3.8 a 3.10.

No que toca à repetibilidade (Tabela 3.8), foi possível concluir que o método desenvolvido se mostrou adequado à quantificação de todas as catinonas em estudo, tendo em conta que apresenta valores de CV iguais ou inferiores a 20% para o calibrador de concentração mais baixa, e valores inferiores a 15% para as restantes gamas de concentração. Tem-se, contudo, a presença de um *outlier* no estudo da molécula de 4-CEC, tendo em conta um valor de CV acima de 15%, que pode desta forma ser desprezado.

Da mesma forma, foi estudada a reprodutibilidade (Tabela 3.9), tendo em conta que o fator que se variou foi o dia da análise, bem como a precisão intermédia (Tabela 3.10). Mais uma vez, os valores de CV encontram-se dentro dos limites exigidos na literatura em relação à adequabilidade do método em termos de precisão, ou seja, da mesma forma que descrito anteriormente, CV iguais ou inferiores a 20% para o valor de LOQ, e valores inferiores a 15% para as restantes concentrações.

É assim possível concluir que o método é preciso.

No que diz respeito à exatidão, expressa pelo ER, constatou-se que os valores obtidos para todas as gamas de concentração estão dentro dos limites aceitáveis como descrito na literatura ( $\pm 20\%$  para o LOQ e  $\pm 15\%$  para as restantes gamas de concentração). Tendo em conta a presença de apenas um *outlier*, pode-se afirmar que o método estudado é exato.

**Tabela 3.8: Resultados obtidos no estudo da repetibilidade do método (*intraday*, n = 6). Os resultados considerados *outliers* encontram-se destacados com as linhas a cinzento.**

Catinona	Concentração Real (ng/mL)	Concentração Estimada (ng/mL)	CV (%)	ER (%)
4-CEC	25	23,64	8,37	- 5,43
	50	44,13	11,95	- 11,73
	200	184,11	6,95	- 7,94
	400	337,41	32,53	- 15,65
	800	1010,21	4,15	14,17
$\alpha$ -PVP	25	19,84	11,30	- 19,64
	50	48,39	8,08	- 3,23
	200	211,36	3,13	5,68
	400	365,95	10,78	- 8,51
	800	860,90	4,14	7,61
4-Cl-PVP	25	19,44	13,69	- 17,09
	50	47,68	7,94	- 4,63
	200	214,45	3,22	7,22
	400	367,18	9,51	- 8,20
	800	816,24	4,09	2,03
MDPV	25	20,69	8,66	- 17,24
	50	47,15	6,78	5,70
	200	213,77	2,88	6,88
	400	380,42	3,36	- 4,89
	800	700,91	8,38	- 12,39

**Tabela 3.9: Resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade do método (*inter-day*, n = 5).**

Catinona	Concentração Real (ng/mL)	Concentração Estimada (ng/mL)	CV (%)	ER (%)
4-CEC	25	25,02	16,21	0,09
	50	50,52	10,55	1,03
	200	192,75	9,96	- 3,63
	400	391,50	10,66	- 2,13
	600	603,80	10,46	0,63
	800	846,34	10,77	5,79
$\alpha$ -PVP	25	24,50	20,34	- 2,00
	50	51,19	13,89	2,38
	200	210,96	6,03	5,48
	400	385,34	5,44	- 3,66
	600	579,98	6,45	- 3,34
	800	807,19	5,01	0,90
4-Cl-PVP	25	24,23	14,67	- 3,09
	50	52,41	9,94	4,83
	200	210,82	5,38	5,41
	400	392,31	5,50	- 1,92
	600	578,70	5,26	- 3,55
	800	801,77	3,85	0,22
MDPV	25	24,67	20,04	- 1,32
	50	51,07	9,42	2,15
	200	210,83	7,92	5,42
	400	388,94	3,00	- 2,76
	600	583,39	3,66	- 2,77
	800	796,60	4,38	- 0,42

**Tabela 3.10: Resultados obtidos no estudo da precisão intermédia do método (*combined intra and interday*, n = 15). Os resultados considerados *outliers* encontram-se destacados com as linhas a cinzento.**

Catinona	Concentração Real (ng/mL)	Concentração Estimada (ng/mL)	CV (%)	ER (%)
4-CEC	50	47,30	9,65	- 5,41
	100	94,79	23,18	- 5,21
	500	502,43	27,22	0,49
$\alpha$ -PVP	50	48,04	10,57	- 3,93
	100	100,82	19,72	0,82
	500	481,13	12,50	- 3,77
4-Cl-PVP	50	46,82	10,01	- 6,36
	100	99,60	14,46	- 0,40
	500	473,49	6,69	- 5,30
MDPV	50	45,71	6,89	- 8,57
	100	98,5	16,94	- 1,49
	500	449,50	13,82	- 10,10

### 3.6.7. Recuperação da Fase de Extração (Eficiência da Extração)

Tendo em conta que o método analítico inclui uma etapa de derivatização e que os analitos derivatizados não são comercializados sob a forma de material de referência, não foi possível avaliar a recuperação absoluta do método. Porém, assumiu-se uma eficiência de 100% para o processo de derivatização de modo

a poder-se avaliar a recuperação da fase de extração [66]. É também importante ter em conta que o analito com que se fortifica a amostra branca não está necessariamente na sua forma nativa [51] e que a eficiência extrativa varia em função da concentração do analito [51], razão pela qual foram estudadas três gamas de concentrações (gama alta, média e baixa).

Segundo os critérios internos do SQTF para métodos quantitativos, a concentração da gama baixa testada no estudo da recuperação deve ser superior ao limite de quantificação (25 ng/mL) e a concentração correspondente à gama alta deve ser igual ou inferior ao limite superior de quantificação (800 ng/mL). Desta forma, as concentrações testadas no estudo deste parâmetro corresponderam a 50, 100 e 500 ng/mL.

Como referido anteriormente, a recuperação pode ser descrita pela Equação 2.4, apresentada no capítulo anterior. Os valores de recuperação médios da fase de extração nos três níveis de concentração estudados encontram-se listados na Tabela 3.11. Nas Tabelas 6.2 a 6.5 do Anexo L encontram-se explicitados os cálculos da recuperação média para as quatro moléculas em estudo.

**Tabela 3.11: Recuperação média (%) da fase de extração, para cada um dos analitos para três níveis de concentração.**

Catinona	Recuperação Média (ST) (%)		
	50 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
4-CEC	116,54 (7,80)	102,18 (4,42)	98,60 (1,94)
$\alpha$ -PVP	98,99 (4,75)	87,25 (1,66)	94,36 (1,34)
4-Cl-PVP	101,07 (2,53)	88,52 (1,34)	96,00 (1,43)
MDPV	101,02 (8,41)	87,84 (1,13)	100,25 (1,68)

É de referir que apesar de ser recomendado que os valores de recuperação obtidos sejam próximos de 100%, podem ser aceites valores mais baixos caso apresentem precisão e exatidão adequadas. Estão também reportados valores de aceitação entre os 70% e os 120% para este critério [51], com um desvio padrão até 20%. Por sua vez, o critério de aceitação do SQTF para a aceitação dos resultados obtidos no estudo da recuperação diz que estes devem estar compreendidos entre os 40% e os 120%.

Desta forma, estando a eficiência da extração entre os 87,25% e os 116,54%, pode-se afirmar que o método apresenta uma eficiência extrativa adequada para todos os analitos. Além disso, como referido anteriormente, destaca-se uma variação dos resultados obtidos no estudo deste parâmetro em função da concentração do analito.

Os resultados obtidos encontram-se também expostos nos cromatogramas da Figura 6.83 do Anexo L, verificando-se sobreposição dos picos cromatográficos tendo em conta os altos valores de recuperação média.

### 3.6.8. Robustez

Como referido anteriormente, a avaliação da robustez visa demonstrar a capacidade de um método analítico para suportar variações sem afetar os respetivos resultados. Desta forma, é um passo determinante no

processo de validação, especialmente tendo em conta que este poderá vir a ser usado noutro equipamento, por outro operador, ou mesmo noutro laboratório [51, 66, 88].

Tendo em conta os resultados obtidos ao longo do processo de validação do método analítico, foi possível concluir que o método desenvolvido para a identificação e quantificação das quatro catinonas por SPE/GC-MS se mostrou robusto, não tendo sido afetada a sua capacidade de identificar e quantificar os analitos por pequenas flutuações experimentais, tais como a mudança de lotes de reagentes, o uso de diferentes soluções de reagentes, a mudança das colunas de extração e cromatográficas ou as diferentes amostras de sangue branco analisadas.

### **3.6.9. Avaliação do Fenómeno de Arrastamento (*Carryover*)**

O fenómeno de *carryover* pode ser definido como a presença de uma certa concentração de um analito presente em concentração elevada em amostras analisadas posteriormente. A presença do composto pode estar confinada à seringa, ao injetor, ao *liner*, à coluna ou ao próprio detetor do aparelho cromatográfico, e daí sobressai a importância das lavagens regulares dos mesmos. É também importante referir que a presença de arrastamento pode afetar não só as amostras analisadas imediatamente a seguir, como toda a sequência de análises posteriores [99].

Por outro lado, este fenómeno pode afetar a precisão e exatidão do método, especialmente em gamas de concentração baixas, podendo também causar o aparecimento de falsos resultados positivos.

Assim, não foram verificados fenómenos de arrastamento na amostra branca injetada após o último calibrador, pelo que se conclui que não há arrastamento pelo menos até 800 ng/mL. A título de exemplo, a Figura 6.84 do Anexo M apresenta um cromatograma de uma amostra branca em comparação com um cromatograma de uma alíquota fortificada com 600 ng/mL.

### **3.7. Análise de Amostras Reais**

Validado o método analítico, demonstrado que era adequado ao propósito a que se destina, e confirmando qualitativa e quantitativamente a presença das catinonas em estudo por SPE/GC-MS em amostras brancas fortificadas, procedeu-se à análise de amostras reais pelo mesmo método. Para tal, selecionaram-se 14 amostras previamente analisadas no SQTf que teriam dado positivas para MDMA, tendo em conta que seria mais provável encontrar amostras positivas para as catinonas em estudo em consumidores deste derivado anfetamínico, devido à semelhança dos efeitos entre estes tipos de substâncias.

Algumas das amostras foram colhidas *post mortem* nos Gabinetes Médico-Legais que atuam na dependência do INMLCF, enquanto que outras estavam relacionadas com a condução influenciada, ao abrigo do Código da Estrada. As amostras datavam de 2017, 2016 e 2015. A Tabela 3.12 apresenta os dados das amostras analisadas, enumerando os compostos para os quais tinham sido obtidos resultados positivos anteriormente.

A estas amostras aplicou-se o método analítico validado. Porém, ao analisar os resultados cromatográficos, foi possível verificar que nenhuma das amostras analisadas possuía qualquer das quatro catinonas em questão, como ilustram os cromatogramas da Figura 6.85 ddo Anexo N. No entanto, esta ausência de positividade pode ter sido também devida ao facto de as amostras terem estado armazenadas por muito tempo, uma vez que se constatou que as catinonas estudadas não eram estáveis na matriz por um longo período de tempo.

**Tabela 3.12: Amostras reais analisadas pelo método analítico desenvolvido.**

Processo	Ano	Caso	Anfetaminas e Derivados	Outras Substâncias
1	2017	Código da Estrada	MDMA	Álcool
2	2017	Código da Estrada	MDMA	Álcool; Canabinóides
3	2017	Código da Estrada	MDMA	Metabolitos da Cocaína
4	2017	Autópsia (Sangue Cardíaco)	MDMA; MDA	Álcool; Metabolitos da Cocaína
5	2017	Autópsia (Sangue Cardíaco)	MDMA, Metanfetamina	Álcool; Benzodiazepinas; Canabinóides; Metabolitos da Cocaína; Metadona,
6	2017	Código da Estrada	MDMA; MDA	Canabinóides
7	2017	Autópsia (Sangue Cardíaco)	MDMA	-
8	2017	Autópsia (Sangue Cardíaco)	MDMA	Canabinóides
9	2016	Código da Estrada	MDMA; MDA	Canabinóides
10	2016	Autópsia (Sangue Periférico)	MDMA	Canabinóides
11	2016	Autópsia (Sangue Cardíaco)	MDMA; MDA	Benzodiazepinas; Benzoilecognina; EME
12	2016	Autópsia (Sangue Cardíaco)	MDMA; MDA	Álcool; Canabinóides
13	2016	Código da Estrada	MDMA	Álcool
14	2015	Código da Estrada	MDMA; MDA; HMMA (precursor da MDA)	Canabinóides

### 3.8. Aplicação do Procedimento de Extração a Amostras de Urina

Depois de validado o método analítico para amostras de sangue total, foi feita uma análise de amostras brancas de urina fortificadas com os analitos, aplicando a mesma técnica e o mesmo método. Porém, os resultados não foram satisfatórios para três dos quatro analitos (sendo a exceção a MDPV), razão pela qual se repetiu o procedimento. No entanto, nunca se verificou linearidade nos resultados analíticos para esses analitos. O método foi testado com duas amostras de urina diferentes, e os resultados foram semelhantes para ambas. Tendo em conta que por esta altura as soluções de trabalho tinham sido preparadas há quatro meses, procedeu-se à preparação de novas soluções. No entanto, os resultados voltaram a ser semelhantes. Desta forma, conclui-se que o método analítico desenvolvido e validado para amostras de sangue total pode ser aplicado em urina para a determinação de MDPV, mas não das restantes catinonas em estudo. De facto,



no que diz respeito à molécula de 4-CEC, não foi possível detetar o pico cromatográfico referente à mesma, o que demonstra uma baixa sensibilidade do método para a deteção desta molécula em urina. A Figura 6.86 do Anexo O apresenta um exemplo das curvas de calibração obtidas para os analitos pela aplicação do método desenvolvido a amostras de urina.

#### 4. Considerações Finais

Esta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de um método analítico para a identificação e quantificação de cinco catinonas sintéticas (4-CEC,  $\alpha$ -PVP, metilona, 4-Cl-PVP e MDPV) já apreendidas em Portugal, de modo a ser inserido na rotina de laboratórios de toxicologia forense. O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do protocolo de colaboração existente entre a FCUL, o LPC/PJ e o INMLCF que existe devido à implementação em Portugal do controlo de NSP através do Decreto-Lei nº 54/2013 de 17 de abril.

Foi assim possível validar o método analítico de um modo simples e eficaz através da técnica de SPE/GC-MS para as catinonas 4-CEC,  $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP e MDPV em amostras de sangue branco total. No entanto não foi possível proceder à validação da metilona, uma vez que não foi obtida sensibilidade adequada; por outro lado, não foi possível extrapolar o processo de validação para as amostras de urina.

As condições cromatográficas permitiram obter uma correta separação dos analitos derivatizados, num tempo apropriado, inferior a 14 minutos. Foram aplicados os critérios em vigor no SQTF para a identificação inequívoca dos analíticos, de acordo com as recomendações da WADA. Como padrão interno foi usada cocaína- $d_3$  devido à ausência dos análogos deuterados dos analitos. O procedimento de extração utilizado foi a SPE de modo misto (Oasis® MCX), sendo que todos os parâmetros capazes de influenciar o procedimento de extração foram otimizados a fim de obter maiores eficiências de extração.

Os resultados da validação do método analítico mostraram que o mesmo seria seletivo para os compostos  $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP e MDPV, tendo-se verificado ausência de seletividade para a 4-CEC na presença de outras drogas de abuso. Assim, a identificação desta catinona poderia estar comprometida em amostras positivas para outros tipos de compostos. No entanto, a probabilidade de existirem amostras reais positivas para tantos compostos diferentes é bastante pequena, pelo que esta aparente ausência de especificidade não constitui um verdadeiro problema. Foi também avaliada a sensibilidade do método, tendo-se evidenciado limites de deteção de 5 ng/mL para as moléculas de  $\alpha$ -PVP, 4-Cl-PVP e MDPV e de 25 ng/mL para a molécula de 4-CEC. Quanto aos limites de quantificação, estes foram de 25 ng/mL. O método foi linear entre 25 e 800 ng/mL, tendo-se, no entanto, registado heterocedasticidade dos resíduos, pelo que se recorreu à utilização de uma regressão linear ponderada, tendo-se usado como fator de ponderação  $\frac{1}{x^2}$  para todos os analitos.

Foi também estudada a estabilidade dos compostos em função do tempo e da temperatura de armazenamento, tendo-se verificado que a molécula de MDPV era a catinona mais estável, seguida da  $\alpha$ -PVP, da 4-Cl-PVP e, por fim, da 4-CEC, sendo que estas duas últimas apresentaram altos valores de degradação em alguns dos ensaios realizados. Os estudos da precisão intermédia e da repetibilidade mostraram-se adequados, podendo-se afirmar que o método é preciso. Os valores de ER obtidos encontram-se também dentro dos limites admitidos pela literatura, permitindo afirmar como tal que o método é exato.

A eficiência da extração revelou recuperações médias entre 87 e 116%, valores aceitáveis e dentro dos limites impostos. Não foram observados fenómenos de arrastamento e o método foi considerado robusto.

O método validado foi aplicado a amostras reais que tinham dado positivas para anfetaminas em testes anteriores, mas não foi possível identificar nenhuma das catinonas em estudo. As catinonas analisadas já tinham sido apreendidas em Portugal, sendo a 4-CEC e a 4-Cl-PVP recentes no mercado europeu, e a metilona e a MDPV já consideradas drogas ilícitas.

É importante salientar que esta dissertação apresenta, pela primeira vez, a validação de um método analítico para identificação e quantificação em amostras de sangue total para as moléculas de 4-CEC e 4-Cl-PVP.

Tendo em conta trabalhos futuros, propõe-se a realização da validação de um método analítico por GC-MS para identificar estas catinonas nouro tipo de amostras, nomeadamente em amostras de urina, para o que será necessário certamente desenvolver um procedimento de extração diferente. Propõe-se ainda a ampliação do leque de substâncias analisadas com a inclusão de outras catinonas disponíveis no mercado, com vista à sua aplicação na rotina dos laboratórios de toxicologia forense. Por outro lado, sugere-se a comparação deste método aplicado a estas substâncias (realizado com substâncias apreendidas pela Polícia Portuguesa e com substâncias sintetizadas em laboratório) a mais produtos apreendidos, de modo a comparar as diferentes purezas a que estes se encontram no mercado de drogas no que diz respeito à validação do método (ou seja, de forma a avaliar se a pureza das substâncias é um fator a ter em conta na aplicação do método analítico validado).

Por último, finaliza-se afirmando que a colaboração entre estas três instituições é de extrema importância para a correta identificação das novas substâncias psicoativas que surgem constantemente no mercado, de modo a permitir uma constante monitorização e controlo destes compostos no mercado de drogas europeu e português.

## 5. Referências Bibliográficas

- [1] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “Relatório Europeu sobre Drogas: Tendências e evoluções”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2017.
- [2] SICAD, “Novas Substâncias Psicoativas” [Online]. Disponível em: [http://www.sicad.pt/pt/cidadao/substanciaspsicoativas/paginas/detalhe-asp?itemld=19&lista=sicad\\_substanciaspsicoativas&bkUrl=/bk/cidadao/substanciaspsicoativas](http://www.sicad.pt/pt/cidadao/substanciaspsicoativas/paginas/detalhe-asp?itemld=19&lista=sicad_substanciaspsicoativas&bkUrl=/bk/cidadao/substanciaspsicoativas) [Acedido a 22 de maio de 2018 às 21h20].
- [3] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “Drugs in focus: Briefing of the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction”. Serviço das Publicações da União Europeia, Bélgica, 2011.
- [4] Zuba D, “Identification of cathinones and their active components of ‘legal highs’ by mass spectrometric methods”. *Trends in Analytical Chemistry*, Elsevier, vol. 32, pp. 15-30, 2012.
- [5] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “Report on the risk assessment of mephedrone in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2011.
- [6] Karila L, Lafaye G, Scocard A, Cottencin O, Benyamina A, “MDPV and  $\alpha$ -PVP use in humans: The twisted sisters”. *Neuropharmacology*, Elsevier, vol. 134, pp. 65-72, 2017.
- [7] Decreto-Lei nº 54/2013, Diário da República, 1ª Série, Nº 75 (17 de abril de 2013), 2250-2254.
- [8] Valente MJ, Guedes de Pinho P, Bastos ML., Carvalho F, Carvalho M, “Khat and synthetic cathinones: a review”. *Archives of Toxicology*, Springer, vol. 88, pp. 15-45, 2014.
- [9] Concheiro M, Castaneto M, Kronstrand R, Huestis MA, “Simultaneous determination of 40 novel psychoactive stimulants in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and library matching”. *Journal of Chromatography A*, Elsevier, vol. 1397, pp. 32-42, 2015.
- [10] Odoardi S, Saverio Romolo F, Strano-Rossi S, “A snapshot on NPS in Italy: Distribution of drugs in seized materials analysed in an Italian forensic laboratory in the period 2013-2015”. *Forensic Science International*, Elsevier, vol. 265, pp. 116-120, 2016.
- [11] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “Relatório Europeu sobre Drogas: Tendências e evoluções”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2018.
- [12] World Health Organization, “Substance abuse” [Online]. Disponível em: [http://www.who.int/topics/substance\\_abuse/en/](http://www.who.int/topics/substance_abuse/en/) [Acedido a 23 de maio de 2018 às 17h00].
- [13] Maciów-Glab M, Rojek S, Kula K, Klys M, “«New designer drugs» in aspects of forensic toxicology”. *Arch Med Sad Kryminol*, vol. 64 (1), pp. 20-33, 2014.
- [14] World Health Organization, “Drug use and road safety: a policy brief”. Genebra, Suíça, 2016.

- [15] Beck O, Franzén L, Bäckberg M, Signell P, Helander A, “Toxicity evaluation of  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP): results from intoxication cases within STRIDA project”. *Clinical Toxicology*, Taylor & Francis Group, vol. 54 (7), pp. 568-575, 2016.
- [16] Alvarez JC, Etting I, Abe E, Villa A, Fabresse N, “Identification and quantification of 4-methylethcathinone (4-MEC) and 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) in hair by LC-MS/MS after chronic administration”. *Forensic Science International*, Elsevier, vol. 270, pp. 39-45, 2017.
- [17] Mercieca G, Odoardi S, Cassar M, Strano Rossi S, “Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamine-like stimulants and other new psychoactive substances in blood and urine by GC-MS”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Elsevier, vol. 149, pp. 494-501, 2018.
- [18] Adamowicz P, Gieroń J, Gil D, Lechowicz W, Skulska A, Tokarczyk B, Zuba D, “Blood concentrations of  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP) determined in 66 forensic samples”. *Forensic Toxicology*, Springer, vol. 34, pp. 227-234, 2016.
- [19] Kuś P, Kusz J, Książek M, Pieprzyca E, Rojkiewicz M, “Spectroscopic characterization and crystal structures of two cathinone derivatives: *N*-ethyl-2-amino-1-phenylpropan-1-one (ethcathione) hydrochloride and *N*-ethyl-2-amino-1-(4-chlorophenyl)propan-1-one (4-CEC) hydrochloride”. *Forensic Toxicology*, Springer, vol. 35, pp. 114-124, 2017.
- [20] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “Portugal, Country Drug Report 2017”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2017.
- [21] Lei nº 7/2017, Diário da República, 1ª Série, Nº 44 (2 de março de 2017), 1128-1129.
- [22] Alsenedi KA, Morrison C, “Determination and long-term stability of twenty-nine cathinones and amphetamine-type stimulants (ATS) in urine using gas chromatography-mass spectrometry”. *Journal of Chromatography B*, Elsevier, vol. 1079, pp. 91-102, 2018.
- [23] Grifell M, Ventura M, Carbón X, Quintana P, Galindo L, Palma A, Fornis I, Gil C, Farre M, Torrens M, “Patterns of use and toxicity of new para-halogenated substituted cathinones: 4-CMC (clephedrone), 4-CEC (4-chloroethcathinone) and 4-BMC (brephedrone)”. *Human Psychopharmacology Clinical and Experimental*, Wiley, vol. 32, 9 pp., 2017.
- [24] Liveri K, Constantinou MA, Afxentiou M, Kanari P, “A fatal intoxication related to MDPV and pentedrone combined with antipsychotic and antidepressant substances in Cyprus”. *Forensic Science International*, Elsevier, vol. 265, pp. 160-165, 2016.
- [25] Meyer MR, Wilhelm J, Peters FT, Maurer HH, “Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography-mass spectrometry”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Springer, vol. 397, pp. 1225-1233, 2010.

- [26] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “Perspectives on Drugs: Injection of synthetic cathinones”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2015.
- [27] Vaiano F, Busardò FP, Palumbo D, Kyriakou C, Fioravanti A, Catalani V, Mari F, Bertola E, “A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC–MS/MS and application to real cases”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Elsevier, vol. 129, pp. 441-449, 2016.
- [28] “Catinonas Sintéticas: «Bath Salts» ou Algo Mais?” [Online]. Disponível em: <http://catinonas2015.wixsite.com/bathsalts/contexto-historico> [Acedido a 18 de julho de 2018 às 19h32].
- [29] Glennon RA, Young R, Martin BR, Dal Cason TA, “Methcathinone («Cat»): An Enantiomeric Potency Comparison”. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Elsevier, vol. 50 (4), pp. 601-606, 1995.
- [30] Taschwer M, Grascher J, Schmid MG, “Development of an enantioseparation method for novel psychoactive drugs by HPLC using a Lux® Cellulose-2 column in polar organic phase mode”. *Forensic Science International*, Elsevier, vol. 270, pp. 232-240, 2017.
- [31] Glicksberg L, Bryand K, Kerrigan S, “Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry”. *Journal of Chromatography B*, Elsevier, vol. 1035, pp. 91-103, 2016.
- [32] Błażewicz A, Bednarek E, Sitkowski J, Poplawska M, Stypulkowska K, Bocian W, Kozerski J, “Identification and structural characterization of four novel synthetic cathinones:  $\alpha$ -methylaminohexanophenone (hexedrone, HEX), 4-bromoethcathinone (4-BEC), 4-chloro- $\alpha$ -pyrrolidinopropiophenone (4-Cl-PPP), and 4-bromo- $\alpha$ -pyrrolidinopentiophenone (4-Br-PVP) after their seizures”. *Forensic Toxicology*, Springer, vol. 35, pp. 317-332, 2017.
- [33] Taschwe M, Weiß JA, Kunert O, Schmid MG, “Analysis and characterization of the novel psychoactive drug 4-chloromethcathinone (clephedrone)”. *Forensic Science International*, Elsevier, vol. 244, pp. 56-59, 2014.
- [34] McMaster MC, “GC/MS: A Practical User’s Guide”, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2008.
- [35] Zuba D, “Identification of cathinones and other active components of ‘legal highs’ by mass spectrometric methods”. *Trends in Analytical Chemistry*, Elsevier, vol. 32, pp. 15-30, 2012.
- [36] Lakshmi HimaBindu MR, Nagala Parameswari S, Gopinath C, “A Review on GC-MS and Method Development and Validation”. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, vol. 4 (3), pp. 42-51, 2013.

- [37] Hübschmann HJ, “Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications”, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KHaA, Weinheim, 2009.
- [38] Harris DC, “Quantitative Chemical Analysis”, 7<sup>th</sup> ed., W. H. Freeman and Company, New York, 2007.
- [39] Namera A, Kawamura M, Nakamoto A, Saito T, Nagao M, “Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones”. *Forensic Toxicology*, Springer, vol. 33, pp. 175-194, 2015.
- [40] Batey JH, “The physics and technology of quadrupole mass spectrometers”. *Vacuum*, Elsevier, vol. 101, pp. 410-415, 2014.
- [41] IUPAC Gold Book, “Selected Ion Monitoring in Mass Spectrometry” [Online]. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/html/S/S05547.html> [Acedido a 18 de julho de 2018 às 20h17].
- [42] Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, Langley GJ, Li L, Naito Y, “Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)”. *Pure Applied Chemistry*, IUPAC, vol. 85 (7), pp. 1515-1609, 2013.
- [43] Vaught JB, Henderson MK, “Biological sample collection, processing, storage and information management”. *IARC Scientific Publications*, World Health Organization, vol. 165, pp. 23-42, 2011.
- [44] Dinis-Oliveira RJ, Vieira DN, Magalhães T, “Guidelines for Collection of Biological Samples for Clinical and Forensic Toxicological Analysis”. *Forensic Sciences Research*, Taylor & Francis Group, vol. 1 (1), pp. 42-51, 2016.
- [45] Lab Manager, “New Approaches Promise Financial and Environmental Cost Savings While Addressing the Challenge of Increased Bio-Specimen Collection” [Online]. Disponível em: <http://www.labmanager.com/laboratory-technology/2009/10/biological-sample-storage-and-management#.W0-Vb9JKjIU> [Acedido a 18 de julho de 2018 às 20h47].
- [46] Drummer OH, “Postmortem toxicology of drugs of abuse”. *Forensic Science International*, Elsevier, vol. 142, pp. 101-113, 2004.
- [47] Butzbach DM, “The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results”. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, Humana Press, vol. 6, pp. 35-45, 2010.
- [48] Niu Z, Zhang W, Yu C, Zhang J, Wen Y, “Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques”. *Trends in Analytical Chemistry*, Elsevier, vol. 102, pp. 123-146, 2018.
- [49] Dalpe-Scott M, Degouffe M, Garbutt D, Drost M, “A Comparison of Drug Concentrations in Postmortem Cardiac and Peripheral Blood in 320 Cases”. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, Taylor & Francis Group, vol. 28 (2), pp. 113-121, 1995.

- [50] Hayashi E, “Varied Needs for Biological Sample Management”. *Clinical Technology, Applied Clinical Trials*, vol. 25 (10), pp. 40-43, 2016.
- [51] Ribani M, Grespan Bottoli CB, Collins CH, Jardim I, Melo L, “Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos”. *Química Nova*, Sociedade Brasileira de Química, vol. 27 (5), pp. 771-780, 2004.
- [52] Almeida C, Rosário P, Serôdio P, Nogueira JMF, “Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica”. *Química*, Sociedade Portuguesa de Química, vol. 95, pp. 69-77, 2004.
- [53] Waters Corporation. Chromatography columns and supplies catalog. Milford (Massachusetts): Waters Corporation, 2004.
- [54] Wiergowski M, Aszyk J, Kaliszan M, Wilczewska K, Sein Anand K, Kot-Wasik A, Jankowski J, “Identification of novel psychoactive substances 25B-NBOMe and 4-CMC in biological material using HPLC-Q-TOF-MS and their quantification in blood using UPLC-MS/MS in case of severe intoxications”. *Journal of Chromatography B*, Elsevier, vol. 1041-1042, pp. 1-10, 2017.
- [55] Sigma-Aldrich, “Guide to Solid Phase Extraction” [Online]. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> [Acedido a 14 de junho de 2018 às 15h36].
- [56] Jardim I, “Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas”. *Scientia Chromatographica*, Instituto Internacional de Cromatografia, vol. 2 (1), pp. 13-25, 2010.
- [57] Matsuta S, Nakanishi K, Miki A, Zaitzu K, Shima N, Kamata T, Nishioka H, Katagi M, Tatsuno M, Tsuboi K, Tsuchihashi H, Suzuki K, “Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method”. *Forensic Science International*, Elsevier, vol. 232, pp. 40-45, 2013.
- [58] Huck CW, Bonn GK, “Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction”. *Journal of Chromatography A*, Elsevier, vol. 885, pp. 51-72, 2000.
- [59] Thurman EM, Mills MS, “Solid-Phase Extraction: Principles and Practice”, 1<sup>st</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998.
- [60] Oliveira EC (1999). *Aplicação da Extração em Fase Sólida na Pré-Concentração de Compostos Fenólicos Clorados em Efluentes de Branqueamento de Celulose*. Tese de Mestrado em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 95 pp.
- [61] Telepchak MJ, August TF, Chaney G, “Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction”, 1<sup>st</sup> ed., Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2004.
- [62] Sigma-Aldrich, “Mixed-Mode SPE Improves Extraction of Pharmaceutical Compounds from Biological Fluids” [Online]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical->



documents/articles/reporter-eu/mixed-mode-spe-improves.html [Acedido a 25 de julho de 2018 às 19h56].

- [63] Relacre. Guia Relacre 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, 2000.
- [64] Kalra K, “Method Development and Validation of Analytical Procedures” [Online]. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/quality-control-of-herbal-medicines-and-related-areas/method-development-and-validation-of-analytical-procedures> [Acedido a 25 de julho de 2018 às 21h34].
- [65] Agilent Technologies “Validation of Analytical Methods” [Online]. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf> [Acedido a 23 de julho às 13h25].
- [66] Peters FT, Maurer HH, “Review: Bioanalytical method validation – How, how much and why?” [Online]. Disponível em: [https://www.gtfc.org/cms/images/stories/media/tk/tk68\\_3/Peters.pdf](https://www.gtfc.org/cms/images/stories/media/tk/tk68_3/Peters.pdf) [Acedido a 23 de julho de 2018 às 13h13].
- [67] Coppola M. Mondola R, “Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as «bath salts» or «plant food»”. *Toxicology Letters*. Elsevier, vol. 211, pp. 144-149, 2012.
- [68] Hagan KS, Reidy L, “Detection of synthetic cathinones in victims of sexual assault”, *Forensic Science International*. Elsevier, vol. 257, pp. 71-74, 2015.
- [69] Comissão Europeia, Proposta de decisão do conselho que sujeita a medidas de controlo a substância 4-iodo-2,5-dimetoxi-N-(2-metoxibenzil)fenetilamina (25I-NBOMe), a substância 3,4-dicloro-N-[[1-(dimetilamino)ciclo-hexil]metil]benzamida (AH-7921), a substância 3,4- metilenodioxipirovalerona (MDPV) e a substância 2-(3-metoxifenil)-2-(etilamino)ciclohexanona (metoxetamina). Bruxelas, 2014.
- [70] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “Relatório Europeu sobre Drogas: Tendências e evoluções”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2014.
- [71] World Health Organization, “1-Phenyl-2-(pyrrolidine-1-yl)pentan-1-one ( $\alpha$ -PVP), Clinical Review Report, Agenda item 5.3”, Expert Committee on Drug Dependence thirty-seventh Meeting. Geneva, 2015.
- [72] Umebachi R, Aoki H, Sugita M, Taira T, Wakai S, Saito T, Inokuchi S, “Clinical characteristics of  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP) poisoning”. *Clinical Toxicology*, Taylor & Francis, vol. 54 (7), pp. 563-567, 2016.
- [73] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “EMCDDA – Europol 2016 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2017.

- [74] Armarego WLF, "Purification of Laboratory Chemicals", 4<sup>th</sup> ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, 1996.
- [75] Bradley D, Williams G, Lawton M, "Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants". *Journal of Organic Chemistry*, vol. 75 (24), pp. 8351-8354, 2010.
- [76] Meltzer PC, Butler D, Deschamps JR, Madras BK, "1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) Analogues: A Promising Class of Monoamine Uptake Inhibitors", *Journal of Medicinal Chemistry*, American Chemical Society, vol. 49, pp. 1420-1432, 2006.
- [77] Graham Solomons TW, Fryhle CB, Snider SA, "Organic Chemistry", 11<sup>th</sup> ed., Wiley, Hoboken, 2013.
- [78] Daeid NN, Savage KA, Ramsay D, Holland C, Sutcliffe OB, "Development of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and other rapid screening methods for the analysis of 16 'legal highs' cathinone derivatives". *Science and Justice*, vol. 54 (1), pp. 22-31, 2014.
- [79] Notes on NMR Solvents [Online]. Disponível em: <https://webspectra.chem.ucla.edu/NotesOnSolvents.html> [Acedido a 8 de agosto de 2018 às 23h37].
- [80] Pretsh E, Clerc T, Seibl J, Simon W, "Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds", 2nd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1983.
- [81] Gaspar H, Bronze S, Oliveira C, Victor BL, Machuqueiro M, Pacheco R, Caldeira MJ, Santos S, "Proactive response to tackle the threat of emerging drugs: Synthesis and toxicity evaluation of new cathinones". *Forensic Science International*, vol. 290, pp. 146-156, 2018.
- [82] Maheux CR, Copeland CR, "Characterization of Three Methcathinone Analogs: 4-Methylmethcathinone, Methylone and bk-MBDB". *Microgram Journal*, vol. 7 (2), pp. 42-49, 2010.
- [83] Kuś P, Kusz J, Książek M, Pieprzyca E, Rojkiewicz M, "Spectroscopic characterization and crystal structures of two cathinone derivatives: 1-(4-chlorophenyl)-2-(1-pyrrolidinyl)-pentan-1-one (4-chloro- $\alpha$ -PVP) sulfate and 1-(4-methylphenyl)-2-(dimethylamino)-propan-1-one (4-MDMC) hydrochloride salts, seized on illicit drug market". *Forensic Toxicology*, Springer, vol. 36, pp. 178-184, 2018.
- [84] Westphal F, Junge T, Rösner P, Sönnichsen F, Schuster F, "Mass and NMR spectroscopic characterization of 3-4-methylenodioxypyrovalerone: A designer drug with  $\alpha$ -pyrrolidinophenone structure". *Forensic Science International*, vol. 190, pp. 1-8, 2009.
- [85] World Anti-Doping Agency, Technical Document on the Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes [Online]. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2015idcr> [Acedido a 15 de Agosto de 2018 às 14h09].
- [86] IPAC. Guia para a acreditação de laboratórios químicos. OGC002, 2011.

- [87] LC GC, “When should an Internal Standard be Used? [Online]. Disponível em: <http://www.chromatographyonline.com/when-should-internal-standard-be-used-0> [Acedido a 3 de setembro de 2018 às 17h03].
- [88] Ermer J, Miller JH, “Method Validation in Pharmaceutical Analysis - A Guide to Best Practice”, 1<sup>st</sup> ed., Ermer J, Miller JH editors, 2005.
- [89] Causon R, “Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion”. *Journal of Chromatography B*, Elsevier, vol. 689, pp. 175-180, 1997.
- [90] Miller JN, Miller JC, “Statistics and chemometrics for analytical chemistry”, 4<sup>th</sup> ed, Harlow: Prentice Hall, 2000.
- [91] Maroto A, Boqué R, Riu J, Rius FX, “Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples”. *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, vol. 446 (1), pp. 133-145, 2001.
- [92] Maroto A, Riu J, Boqué R, Rius FX, “Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process”. *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, vol. 391 (2), pp. 173-185, 1999.
- [93] ICH, “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)” [Online]. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf) [Acedido a 4 de setembro de 2018 às 20h45].
- [94] Science Direct, “Derivatization” [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/derivatization> [Acedido a 28 de agosto de 2018 às 16h47].
- [95] Restek, “Why Derivatize?” [Online]. Disponível em: <https://www.restek.com/pdfs/CFTS1269.pdf> [Acedido a 28 de agosto de 2018 às 16h57].
- [96] Waters, SPE Oasis [Online]. Disponível em: [http://www.waters.com/waters/pt\\_PT/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?cid=513209&locale=pt\\_PT](http://www.waters.com/waters/pt_PT/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?cid=513209&locale=pt_PT) [Acedido a 15 de agosto de 2018 às 14h20].
- [97] Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD, “Validation of bioanalytical chromatographic methods”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Elsevier, vol. 17 (2), pp. 193-218, 1998.
- [98] Barroso M, Dias M, Vieira DN, López-Rivadulla M, Queiroz JA, “Simultaneous quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, codeine, 6-acetylcodeine and tramadol in hair using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Springer, vol. 396 (8), pp. 3059-3069, 2010.
- [99] Hughes NC, Wong EYK, Fan J, Bajaj N, “Determination of Carryover and Contamination for Mass Spectrometry – Based Chromatographic Assays”. *The AAPS Journal*, Springer, vol. 9 (3), pp. 353-360, 2007.

## 6. Anexos

### Anexo A: Síntese do Padrão de MDPV

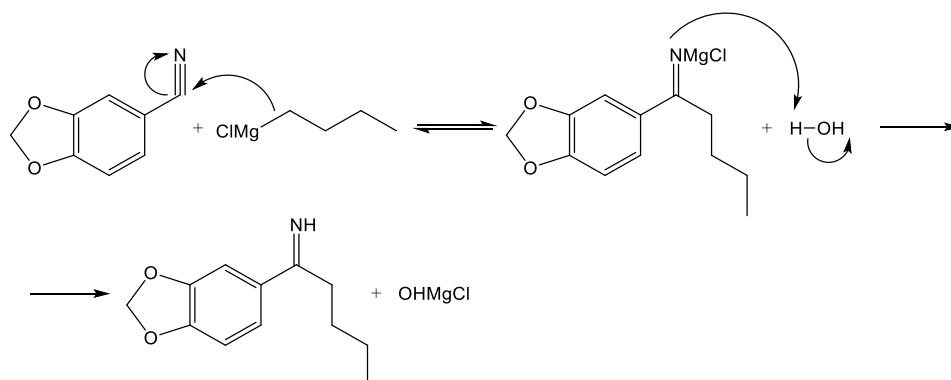


Figura 6.1: Mecanismo de formação de uma imina intermediária por adição nucleofílica de piperonilnitrilo a cloreto de butilmagnésio.

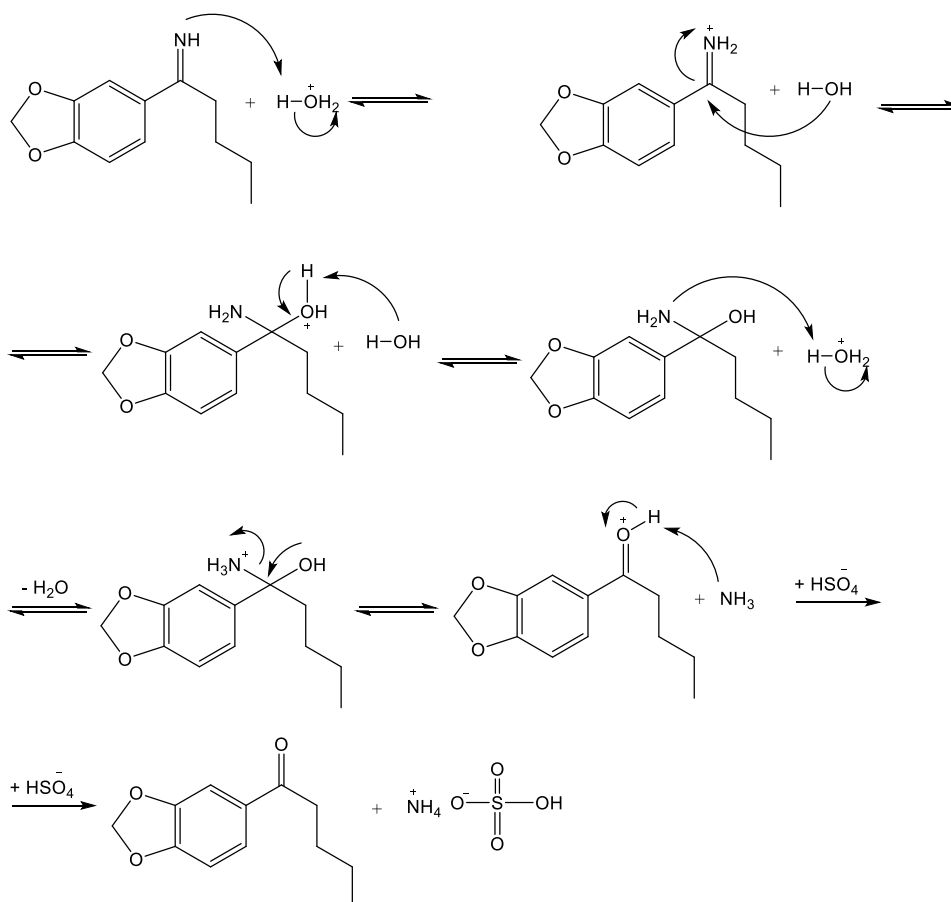


Figura 6.2: Mecanismo de formação da cetona de partida após hidrólise da imina intermediária.

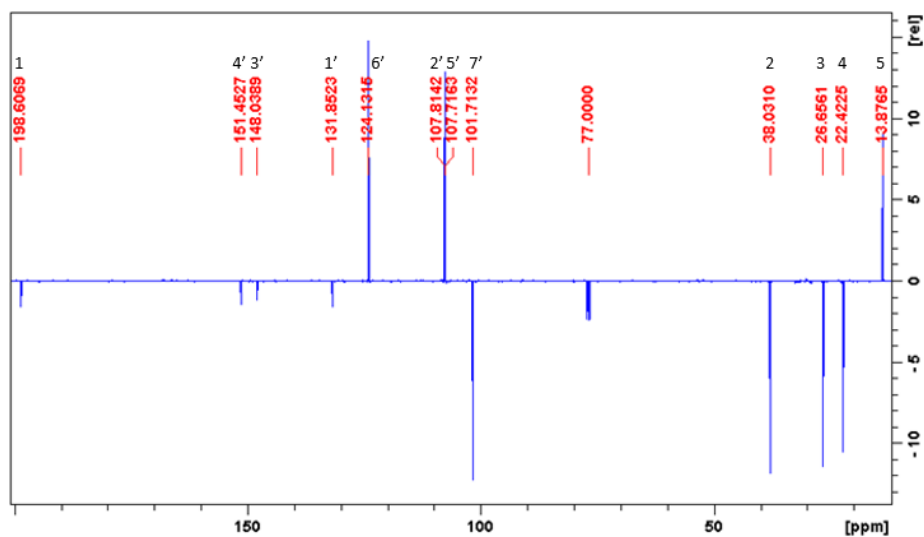


Figura 6.3: Espectro NMR  $^{13}\text{C}$  APT da piperonilbutilcetona.

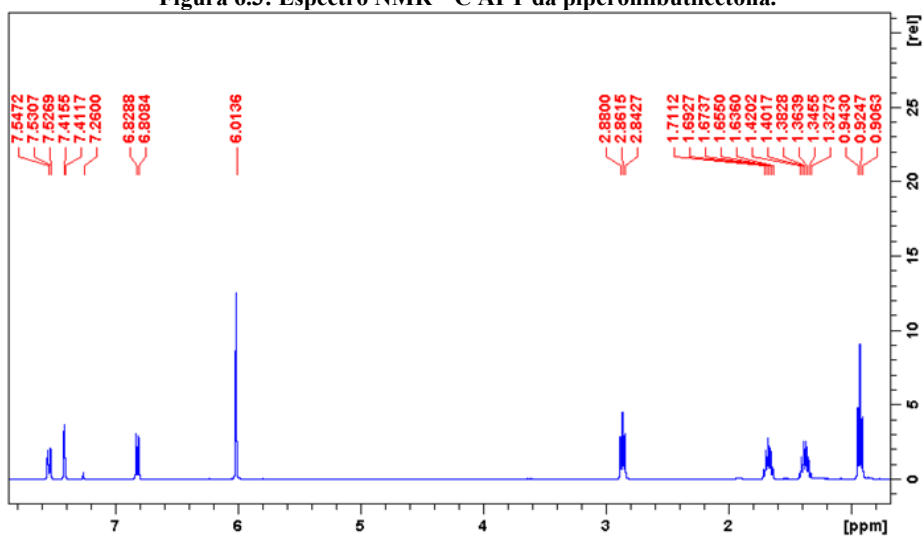


Figura 6.4: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da piperonilbutilcetona.

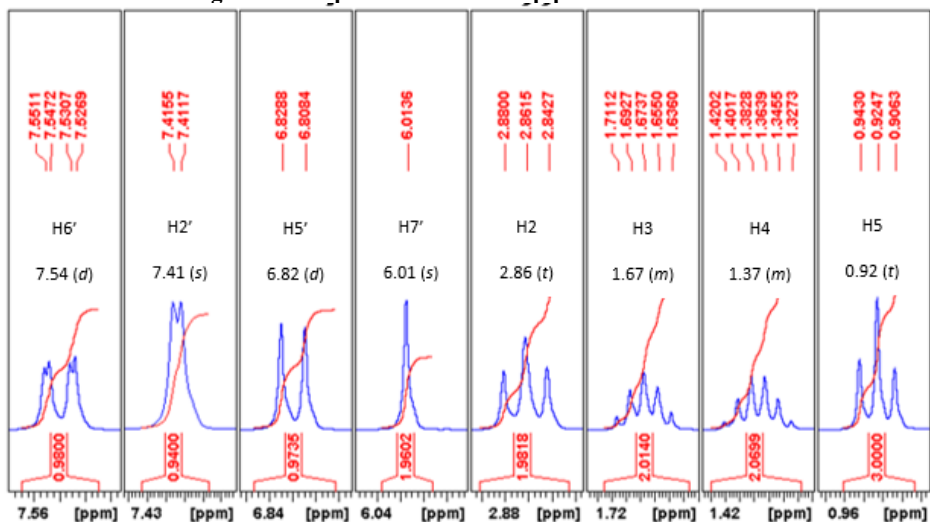


Figura 6.5: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da piperonilbutilcetona (ampliação).

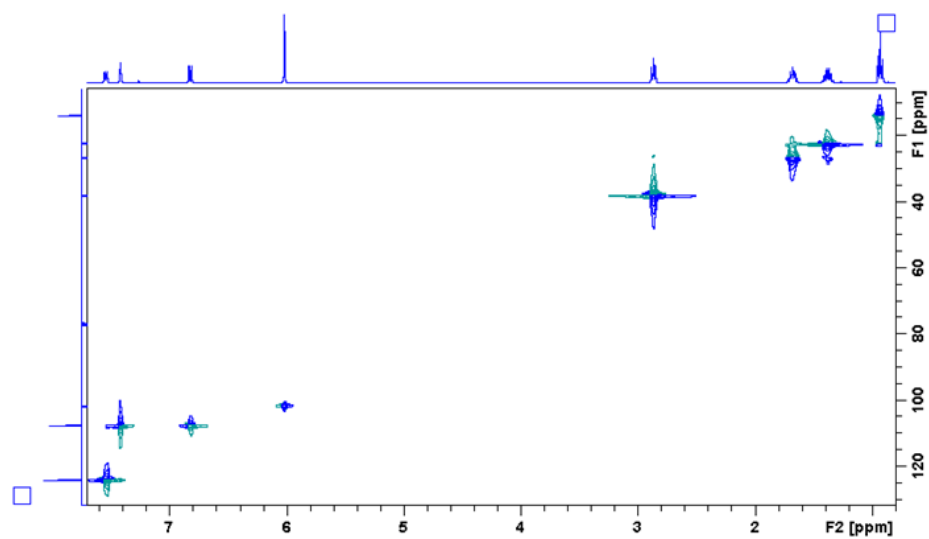


Figura 6.6: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da piperonilbutilcetona (ampliação).

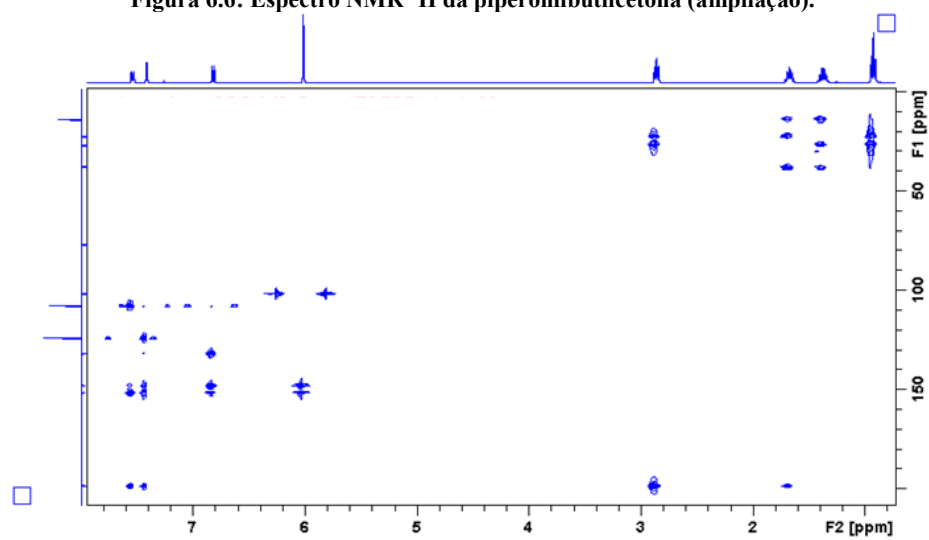


Figura 6.7: Espectro NMR HMBC da piperonilbutilcetona.

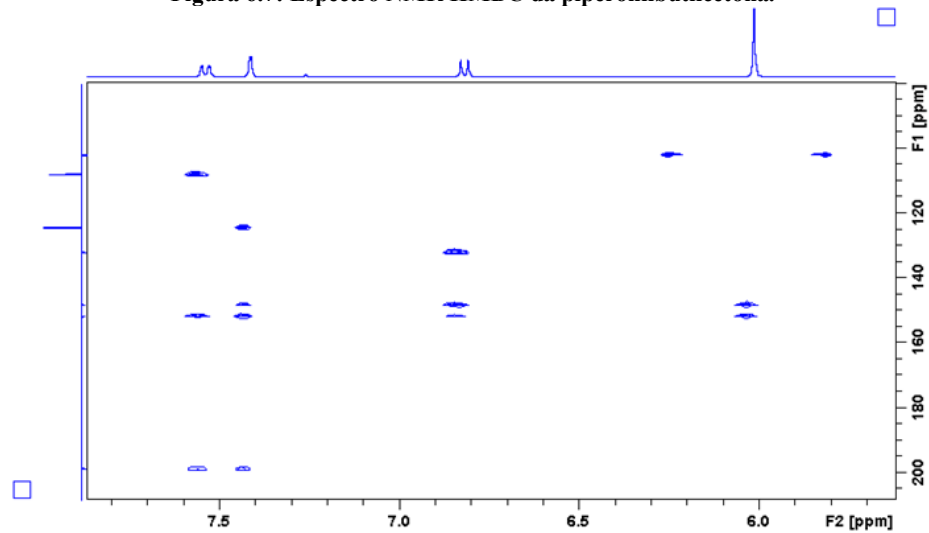


Figura 6.8: Espectro NMR HMBC da piperonilbutilcetona (ampliação).

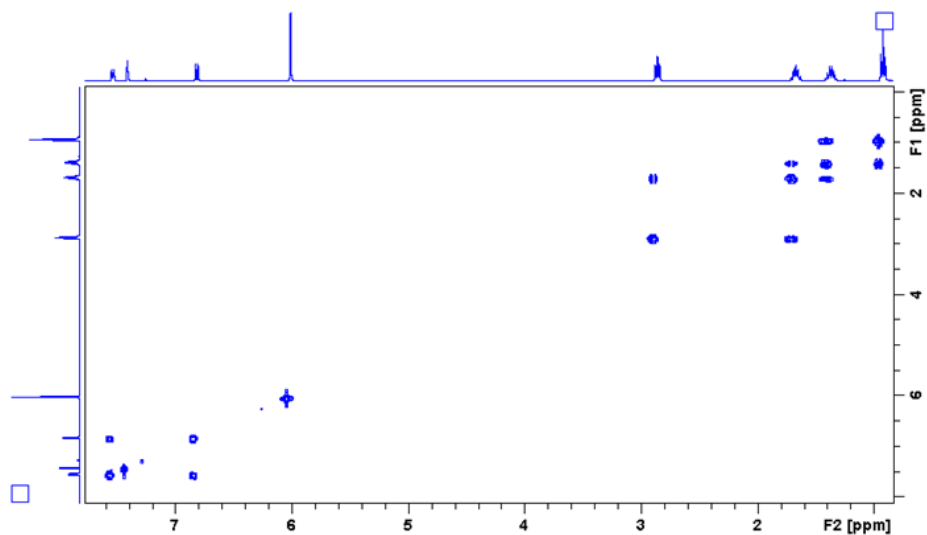


Figura 6.9: Espectro NMR COSY da piperonilbutilcetona.

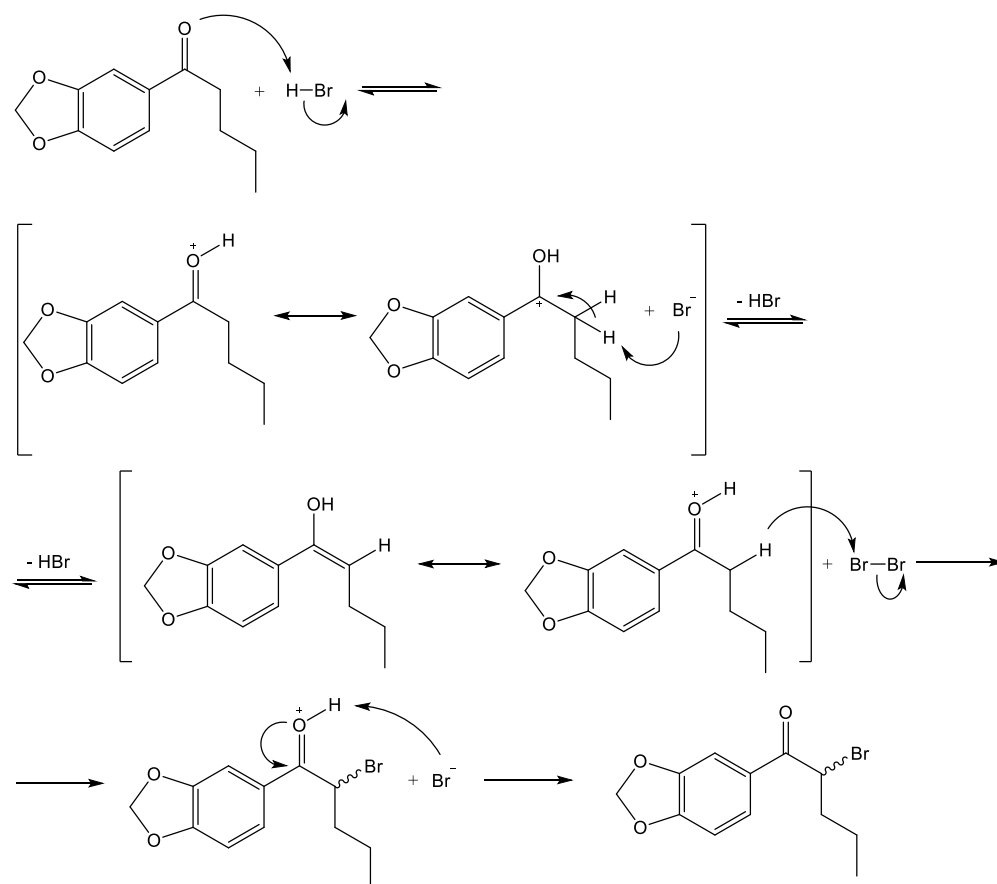


Figura 6.10: Mecanismo de  $\alpha$ -halogenação da piperonilbutilcetona, que forma a piperonilbromobutilcetona.

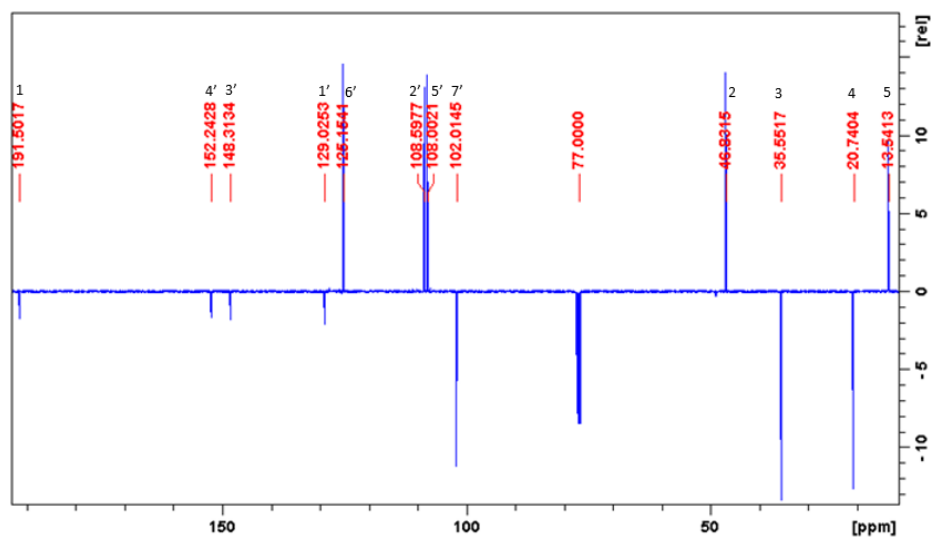


Figura 6.11: Espectro NMR  $^{13}\text{C}$  APT da piperonilbromobutilcetona.

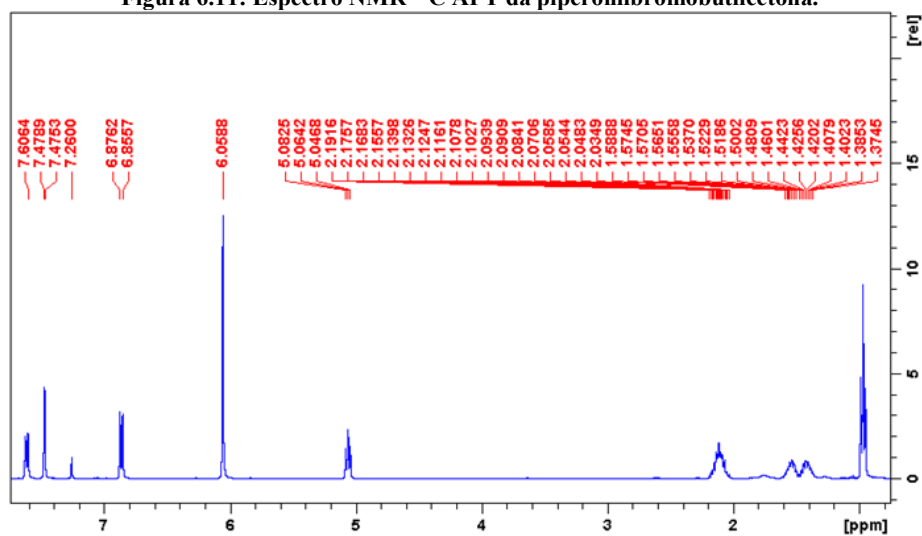


Figura 6.12: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da piperonilbromobutilcetona.

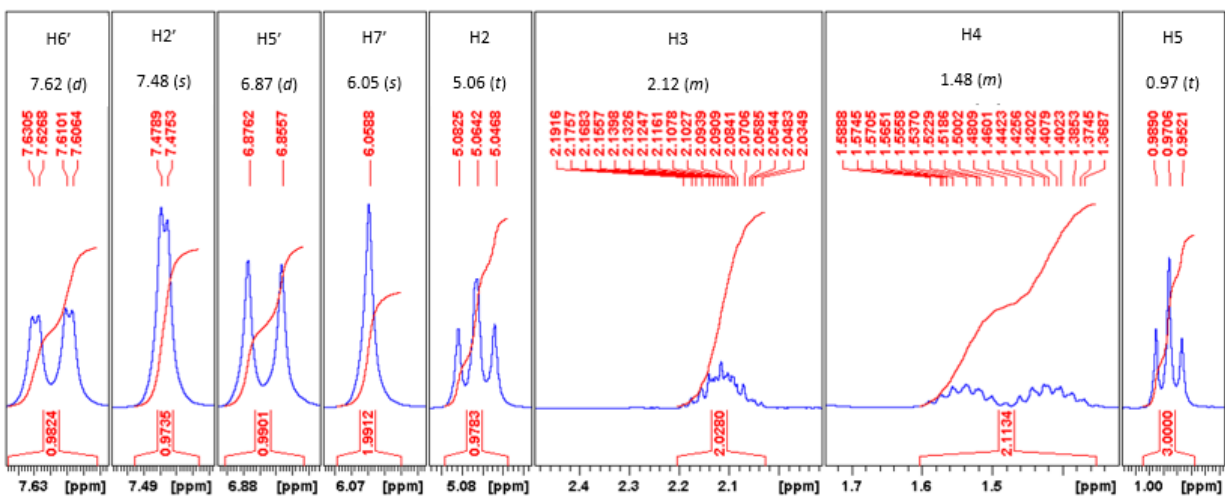


Figura 6.13: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da piperonilbromobutilcetona (ampliação).



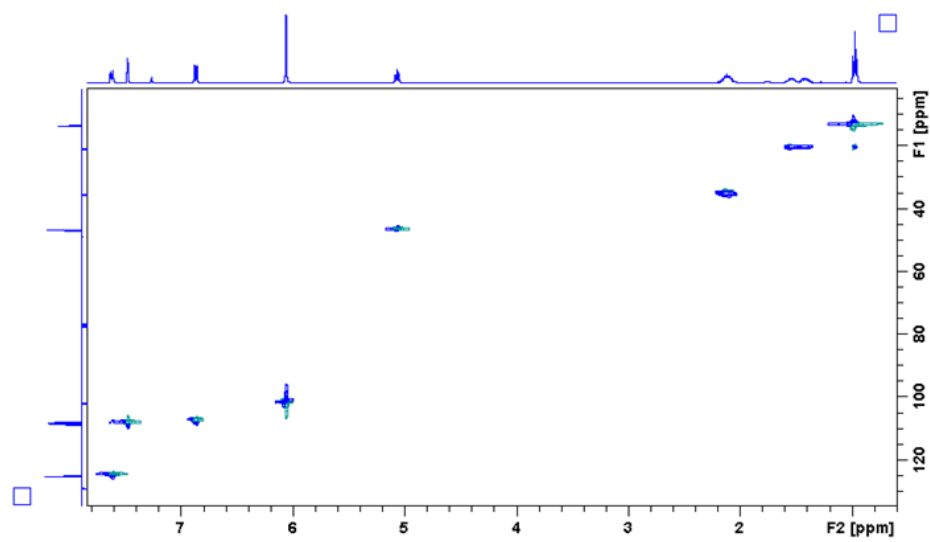


Figura 6.14: Espectro NMR HSQC editado da piperonilbromobutilcetona.

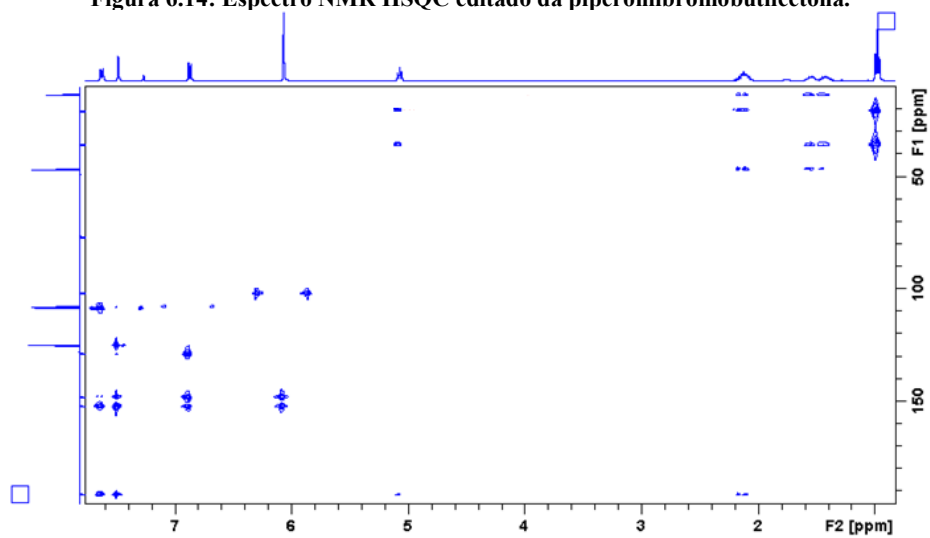


Figura 6.15: Espectro NMR HMBC da piperonilbromobutilcetona.

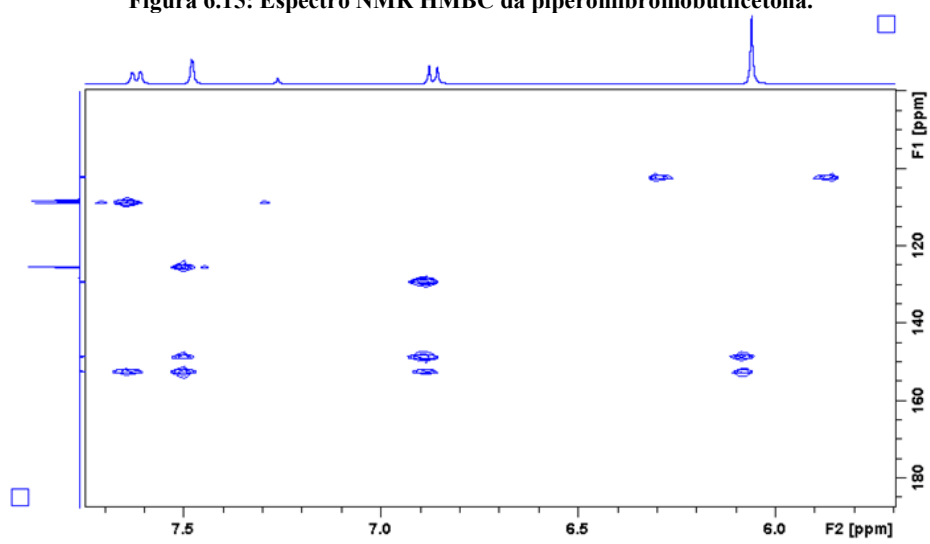


Figura 6.16: Espectro NMR HMBC da piperonilbromobutilcetona (ampliação).

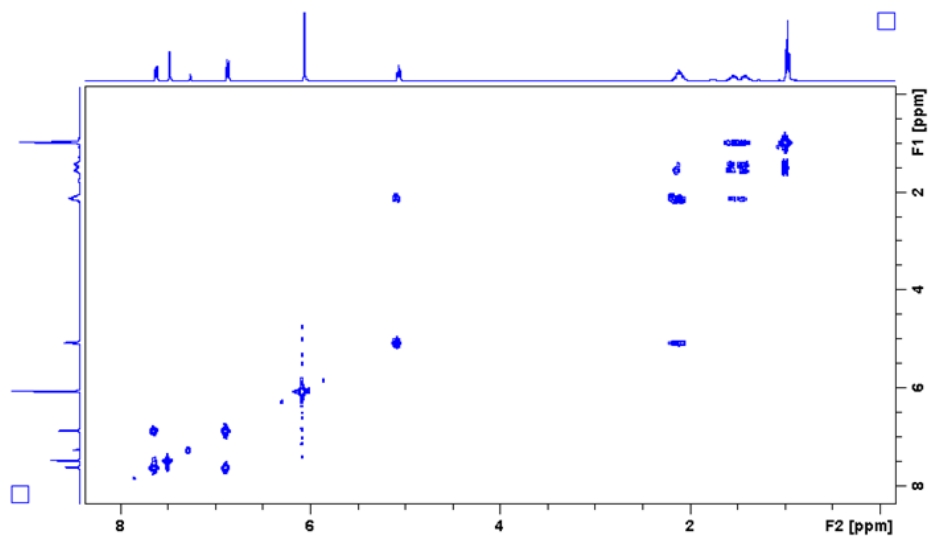


Figura 6.17: Espectro NMR COSY da piperonilbromobutlilcetona.

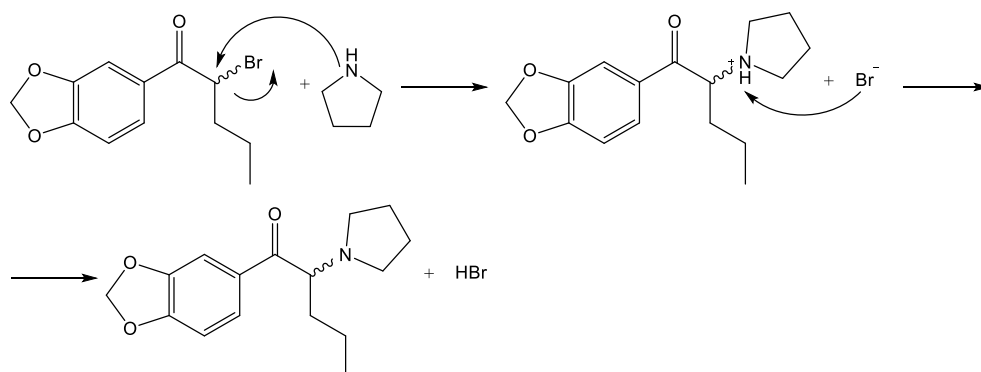


Figura 6.18: Mecanismo  $S_N2$  entre a piperonilbromobutlilcetona e a pirrolidina, que culmina na formação de MDPV na forma de base livre.

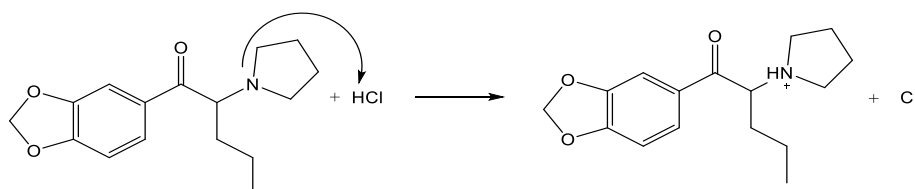


Figura 6.19: Formação do MDPV na forma de cloridrato pela adição de ácido clorídrico etéreo ao MDPV em forma de base livre.

## Anexo B: Caracterização Estrutural dos Compostos em Estudo

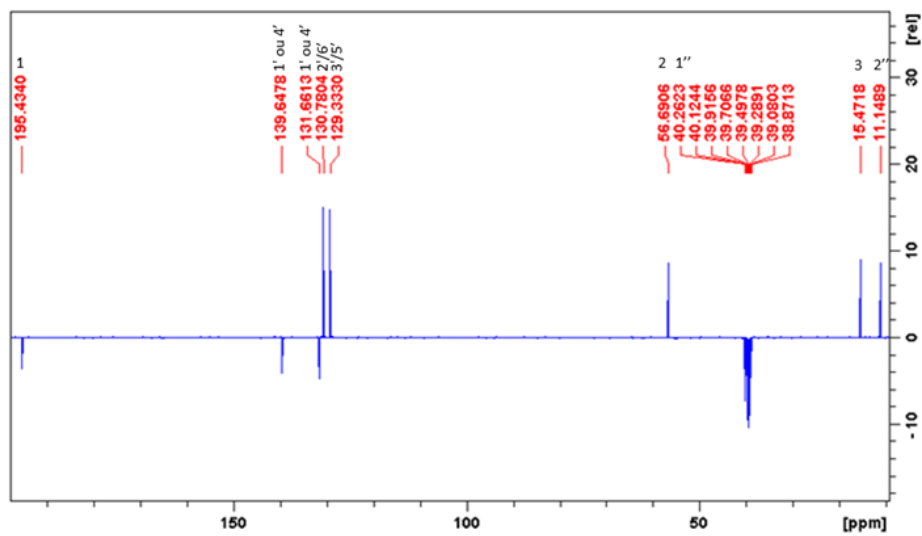


Figura 6.20: Espectro NMR  $^{13}\text{C}$  APT da 4-CEC.

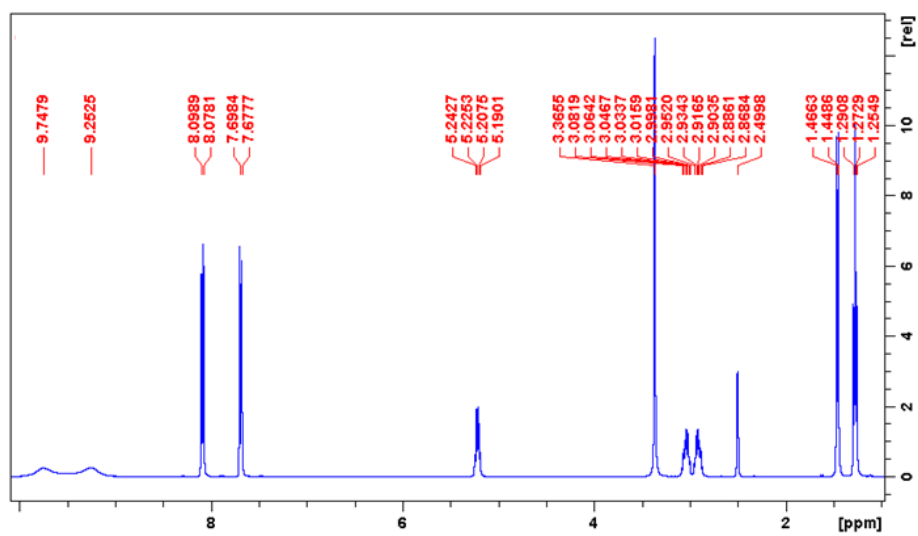


Figura 6.21: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da 4-CEC.

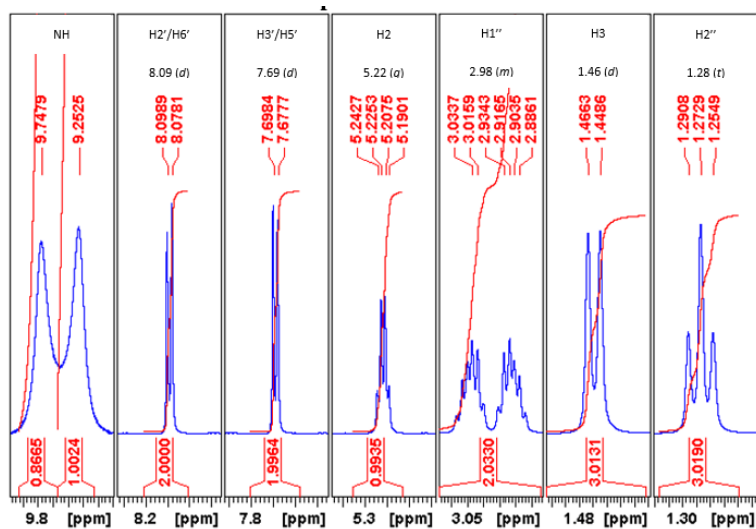


Figura 6.22: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da 4-CEC (ampliação).

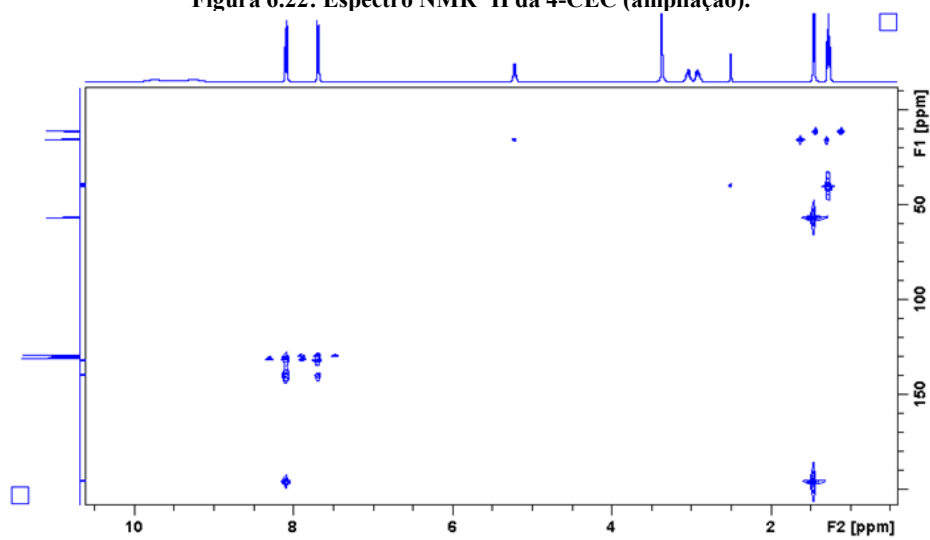


Figura 6.23: Espectro NMR HMBC da 4-CEC.

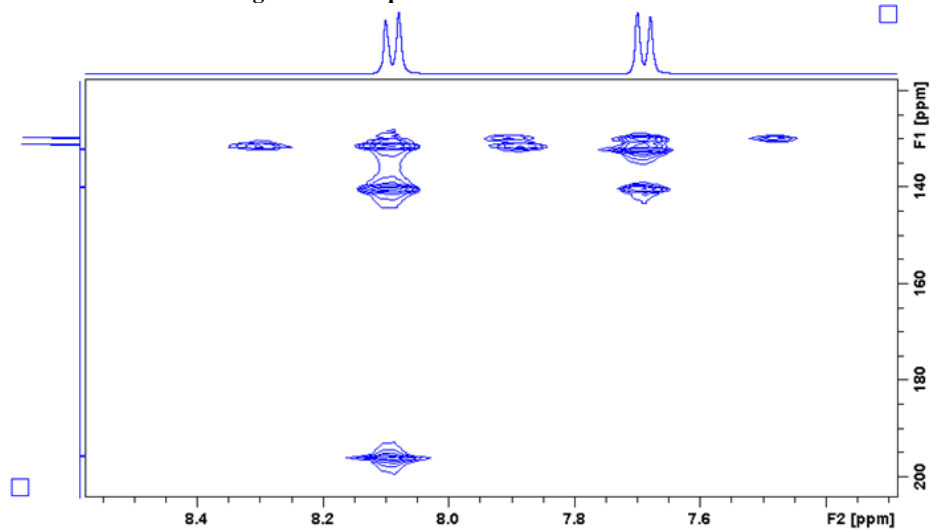


Figura 6.24: Espectro NMR HMBC da 4-CEC (ampliação).

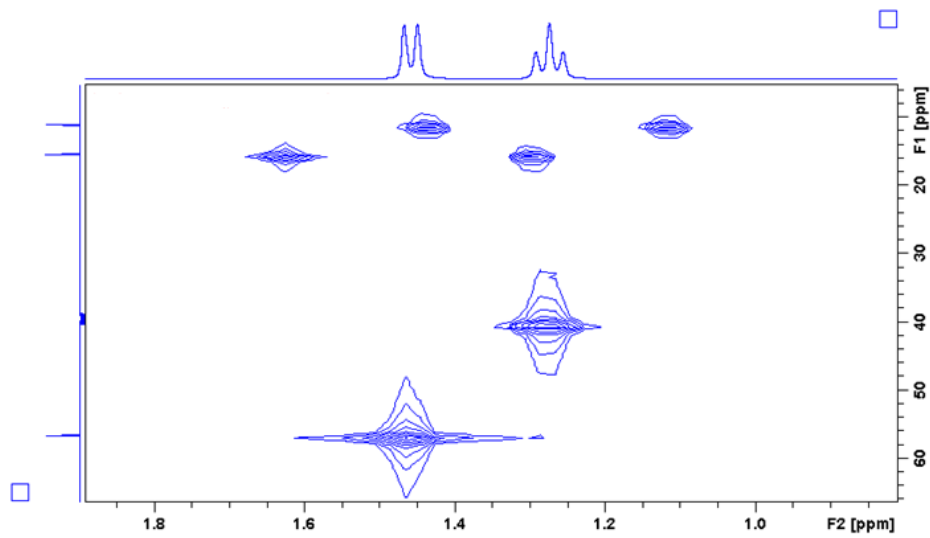


Figura 6.25: Espectro NMR HMBC da 4-CEC (ampliação).

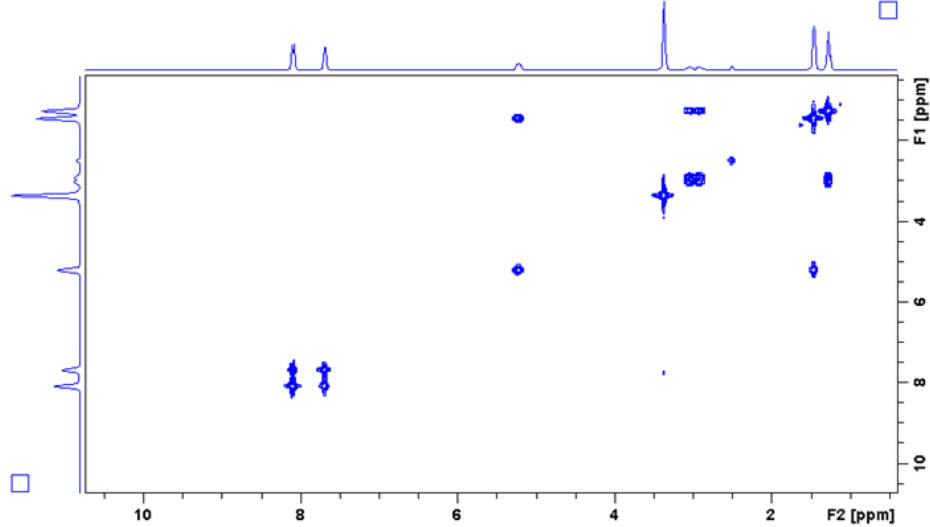


Figura 6.26: Espectro NMR COSY da 4-CEC.

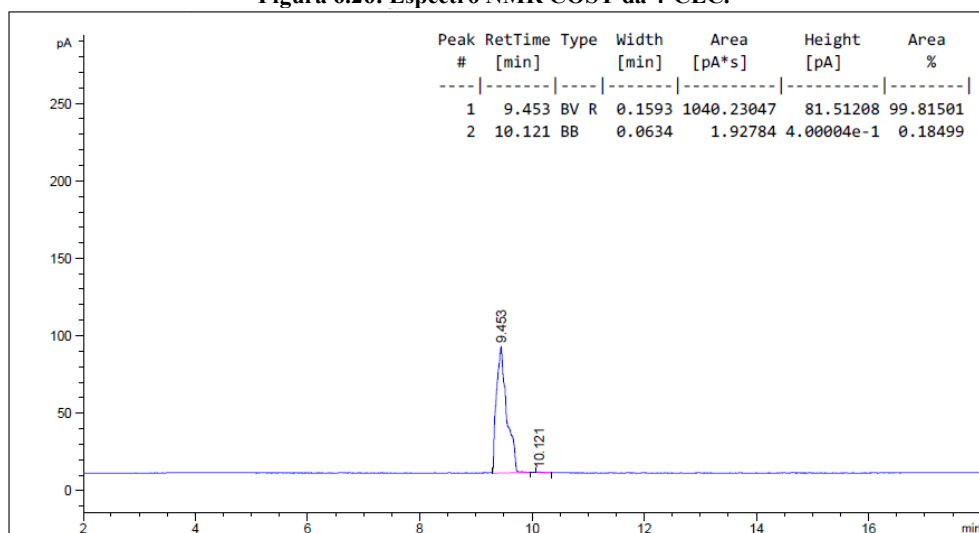


Figura 6.27: Cromatograma GC-FID da análise 5 da 4-CEC.

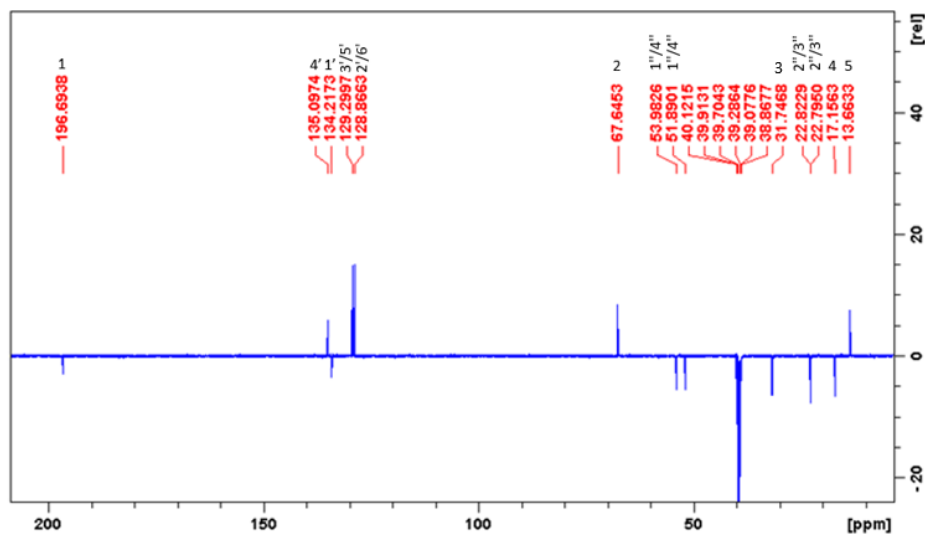


Figura 6.28: Espectro NMR  $^{13}\text{C}$  APT da  $\alpha$ -PVP.

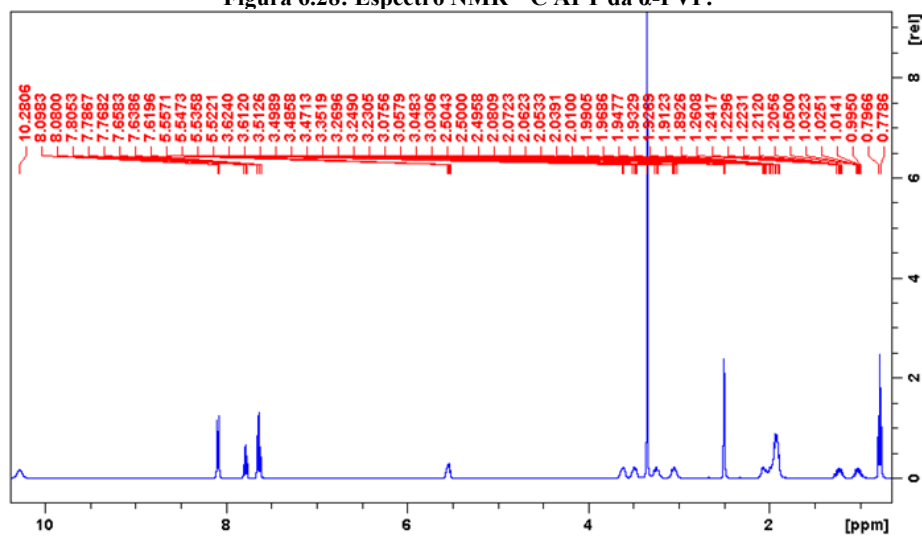


Figura 6.29: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da  $\alpha$ -PVP.

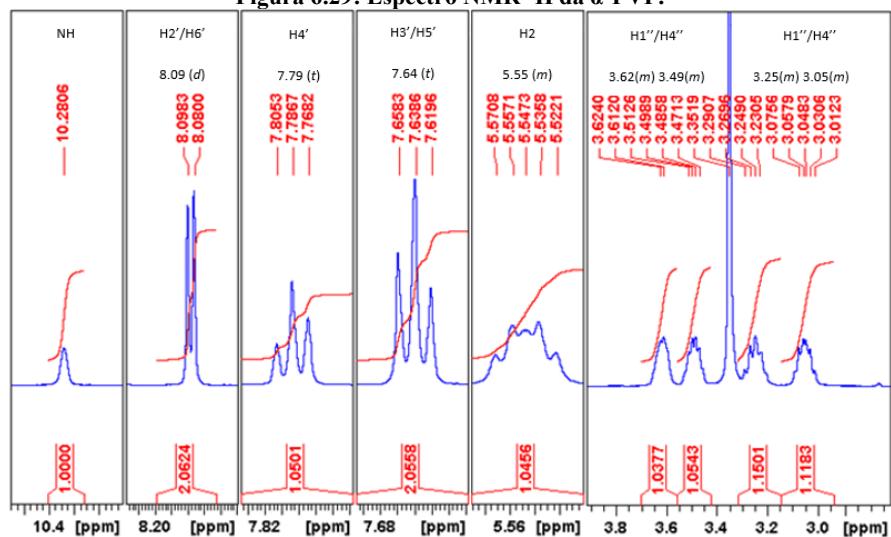


Figura 6.30: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da  $\alpha$ -PVP (ampliação).

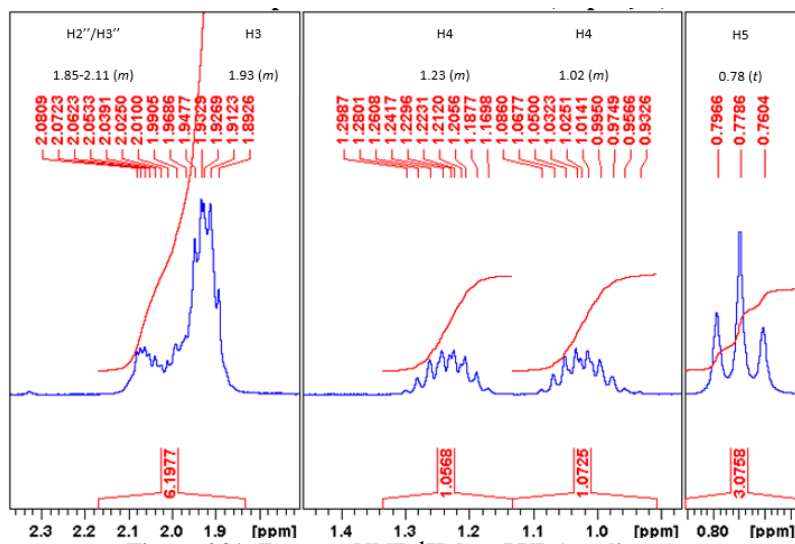


Figura 6.31: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da  $\alpha$ -PVP (ampliação).

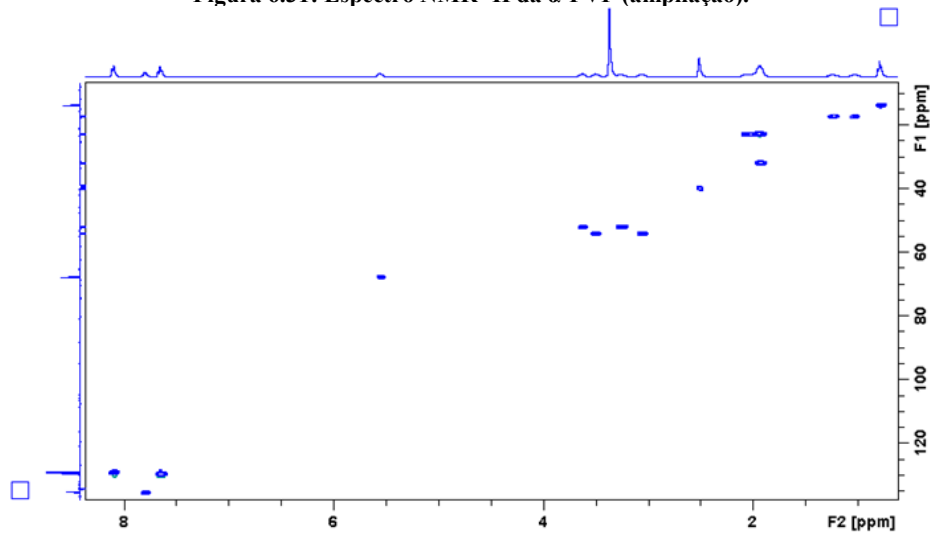


Figura 6.32: Espectro NMR HSQC editado da  $\alpha$ -PVP.

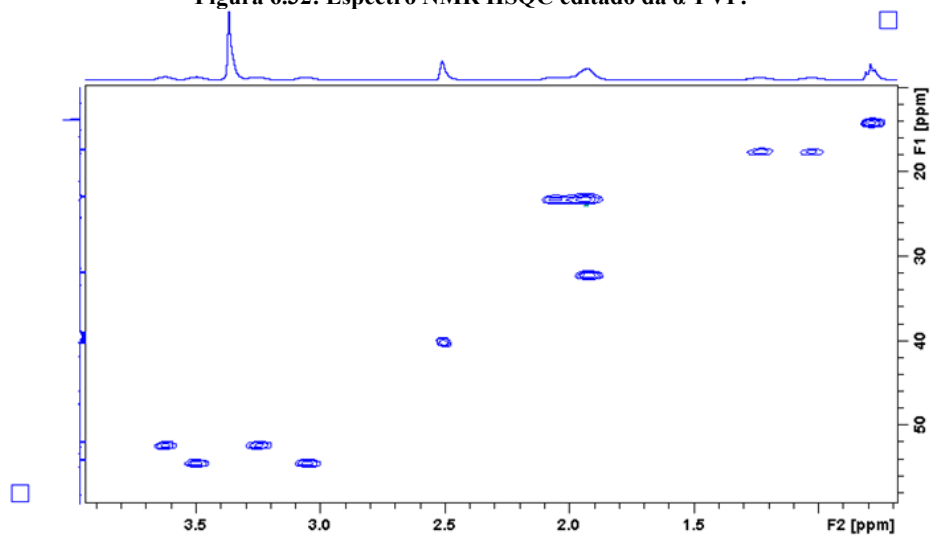


Figura 6.33: Espectro NMR HSQC editado da  $\alpha$ -PVP (ampliação).

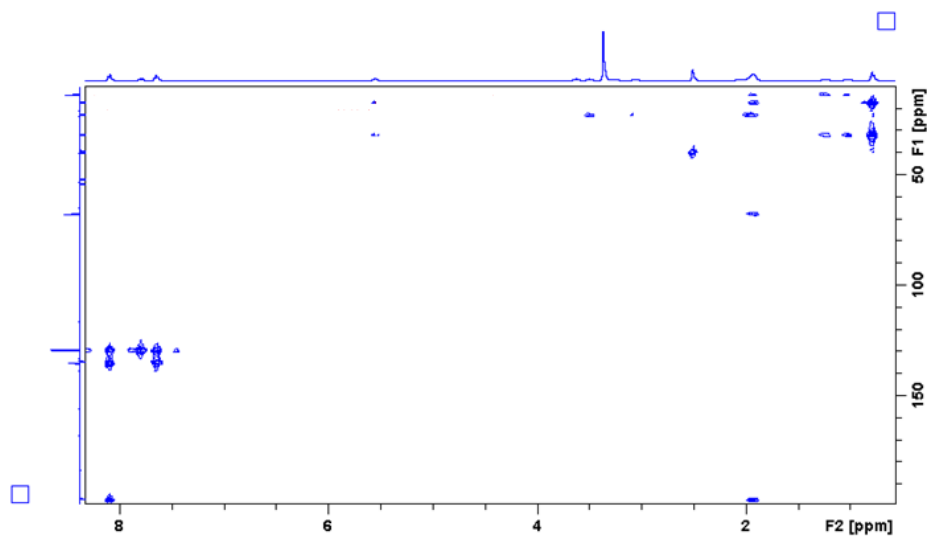


Figura 6.34: Espectro NMR HMBC da  $\alpha$ -PVP.

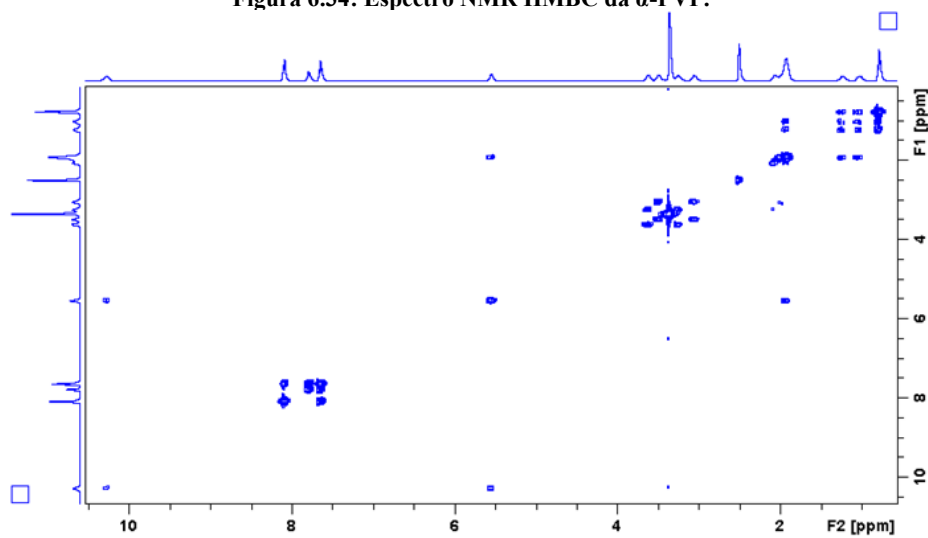


Figura 6.35: Espectro NMR COSY da  $\alpha$ -PVP.

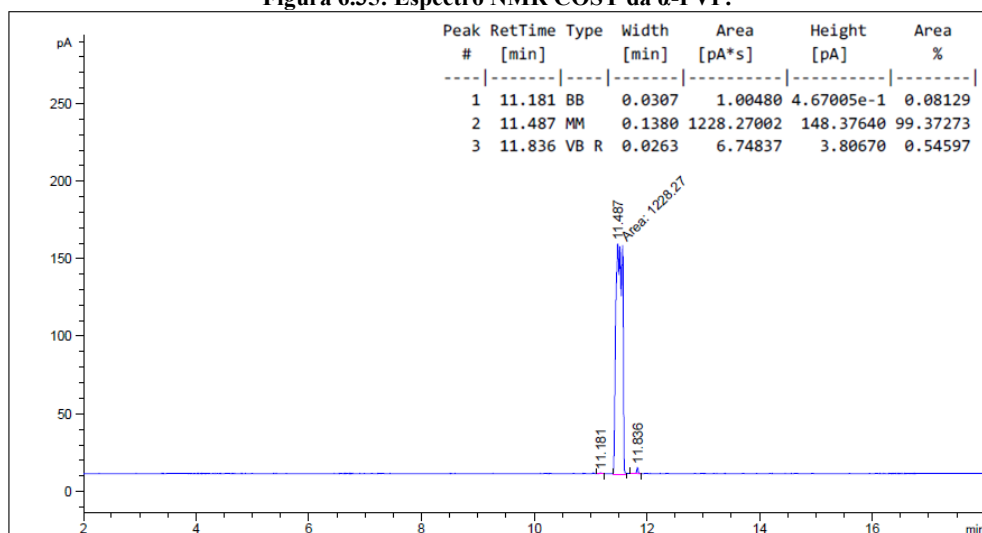


Figura 6.36: Cromatograma GC-FID da análise 6 da  $\alpha$ -PVP.



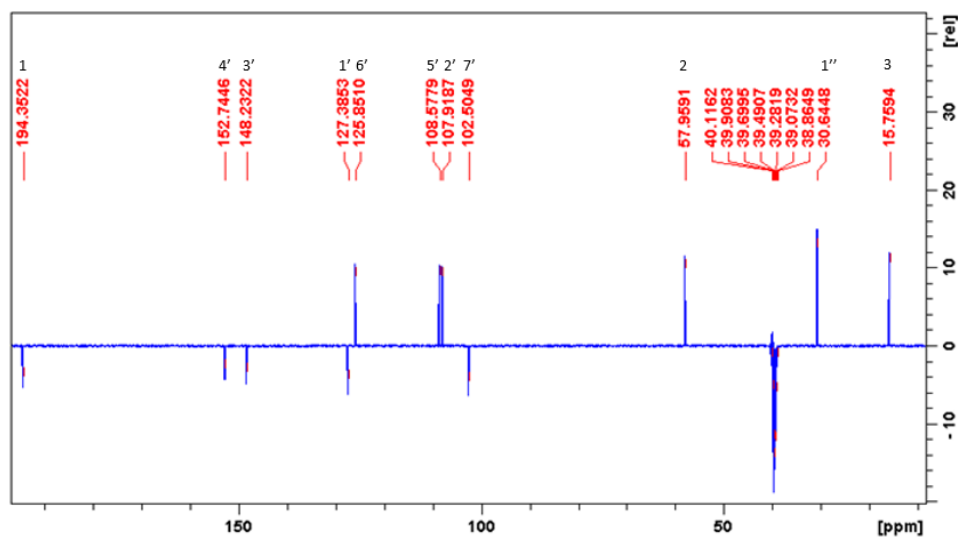


Figura 6.37: Espectro NMR  $^{13}\text{C}$  APT da metilona.

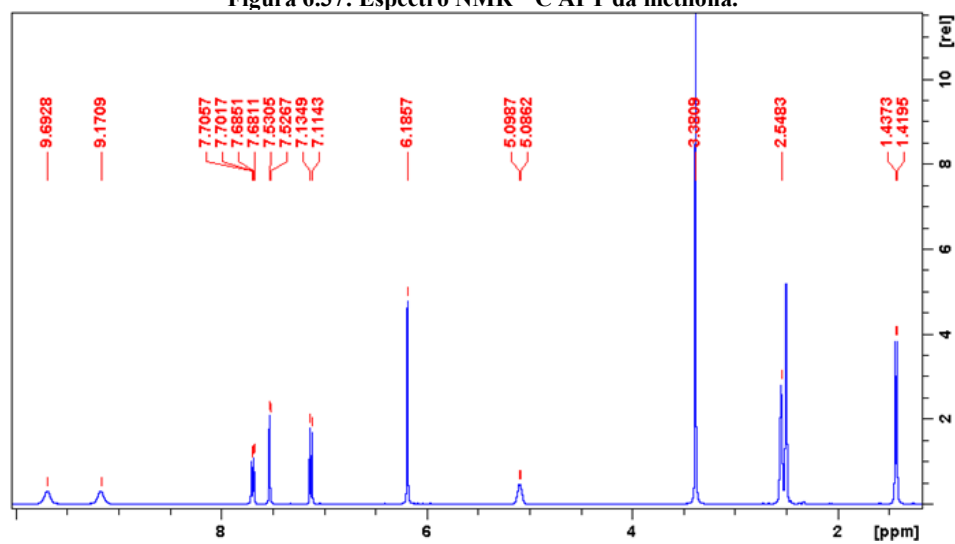


Figura 6.38: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da metilona.

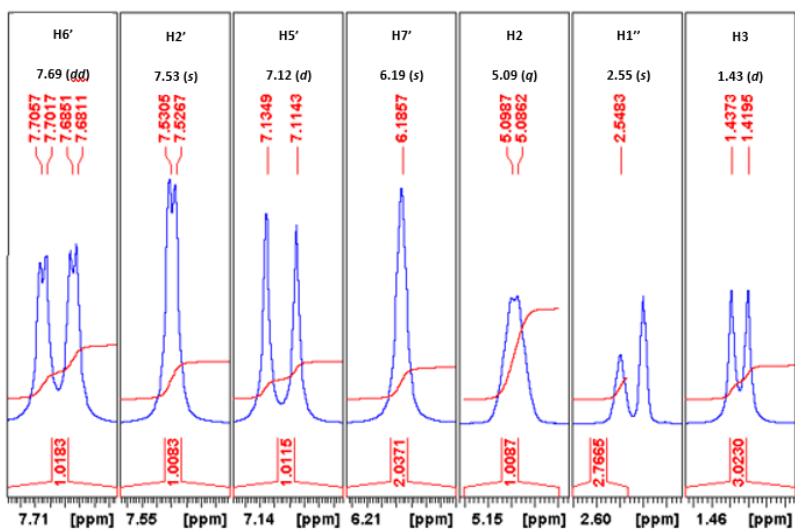


Figura 6.39: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da metilona (ampliação).

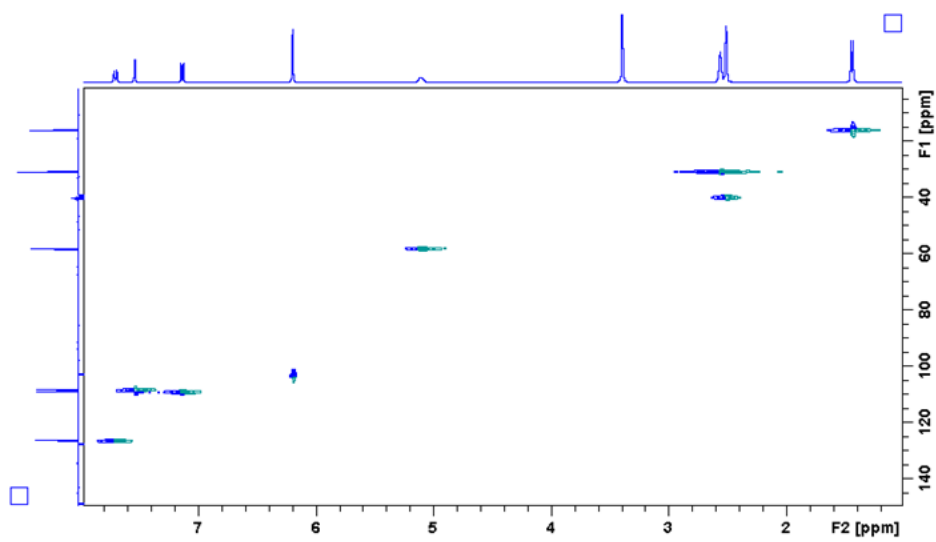


Figura 6.40: Espectro NMR HSQC editado da metilona.

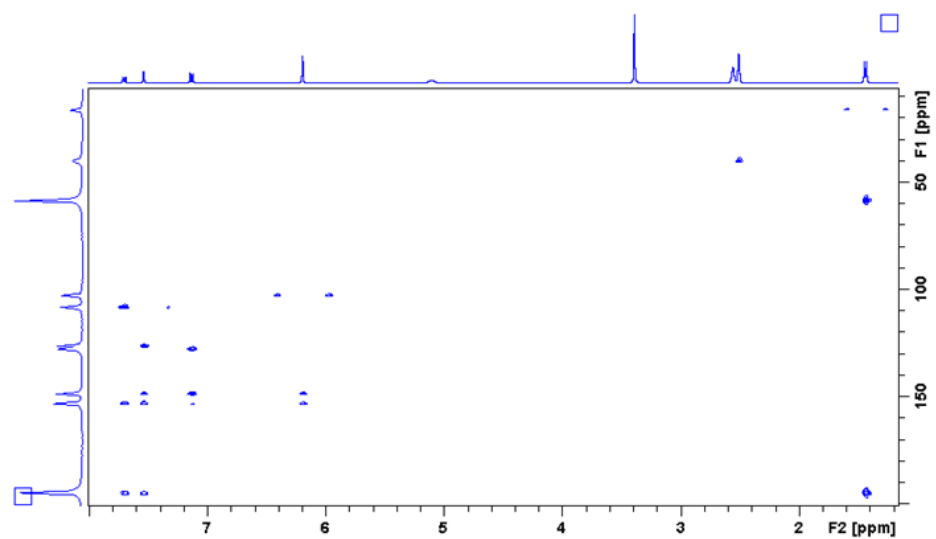


Figura 6.41: Espectro NMR HMBC da metilona.

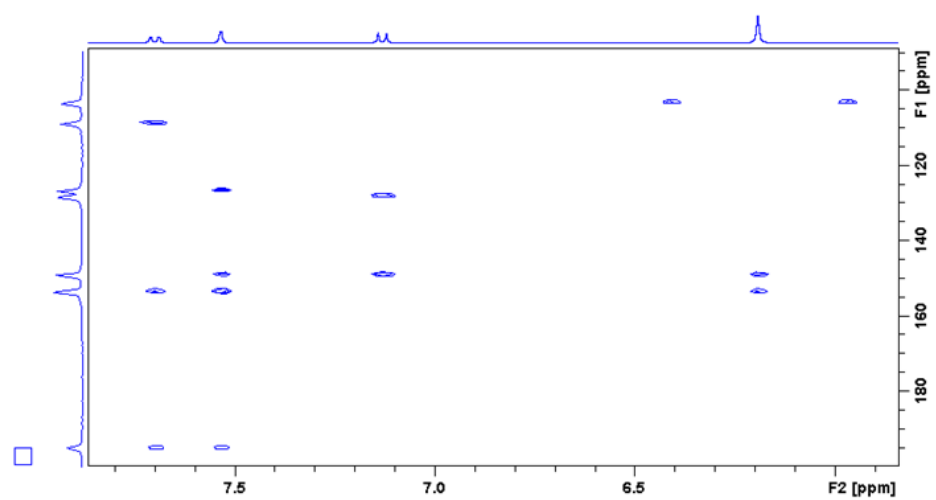


Figura 6.42: Espectro NMR HMBC da metilona (ampliação).

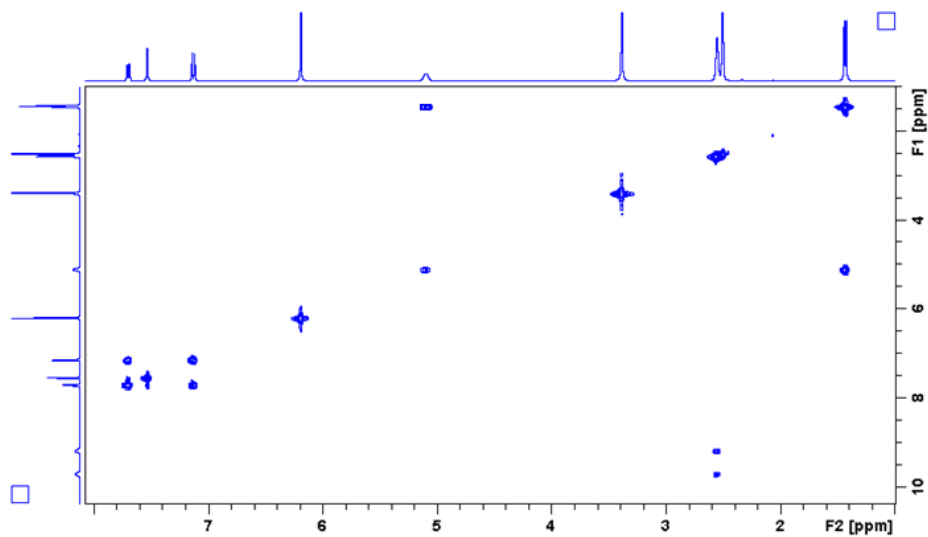


Figura 6.43: Espectro NMR COSY da metilona.

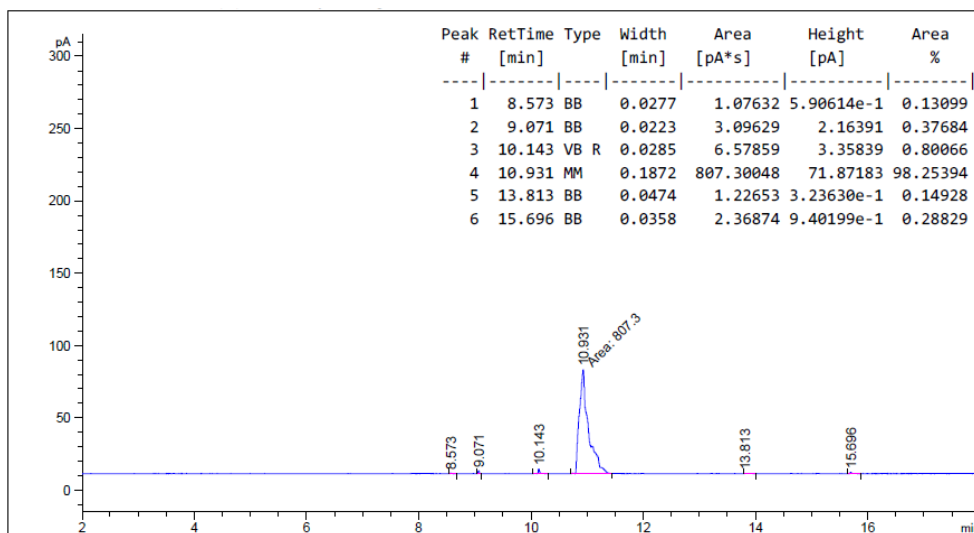


Figura 6.44: Cromatograma GC-FID da análise 5 da metilona.

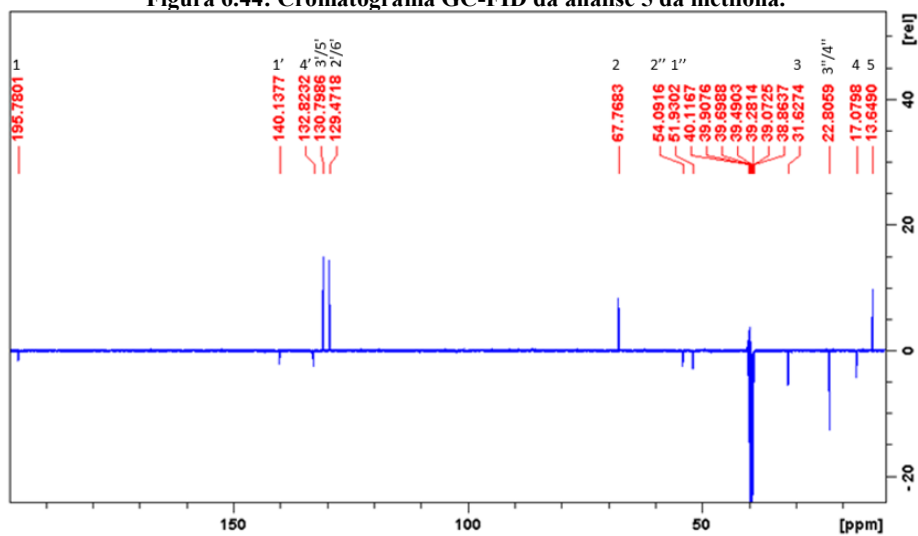


Figura 6.45: Espectro NMR  $^{13}\text{C}$  APT da 4-Cl-PVP.

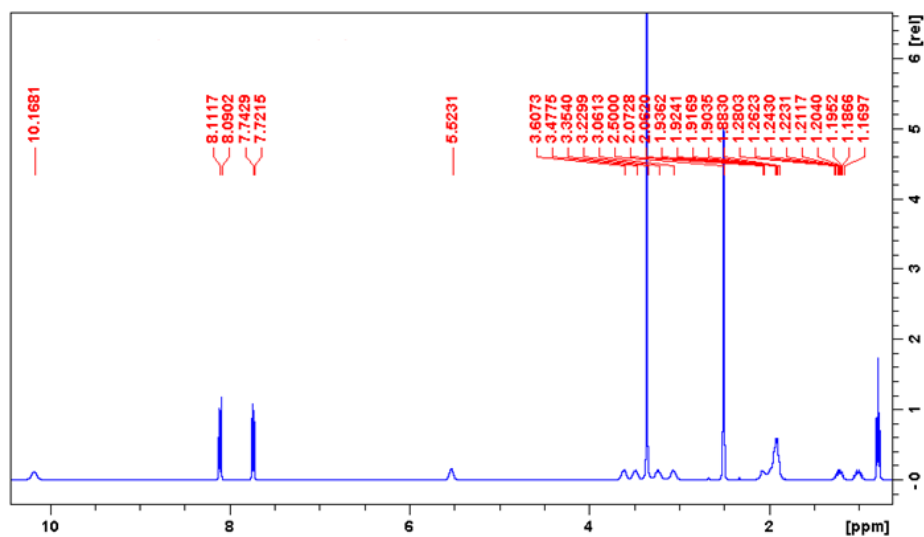


Figura 6.46: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da 4-Cl-PVP.

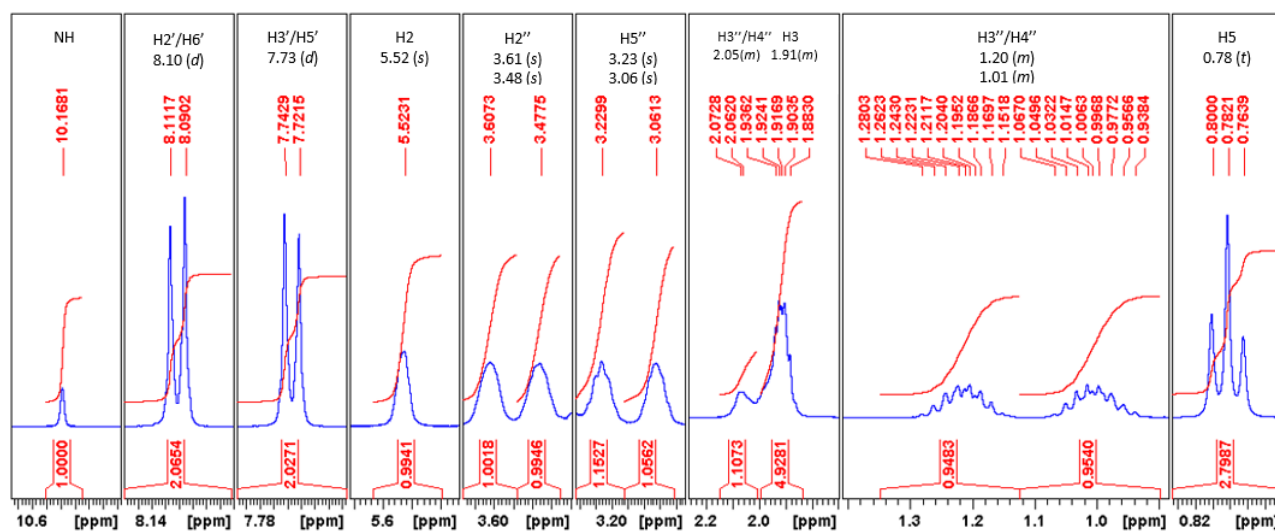


Figura 6.47: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da 4-Cl-PVP (ampliação).

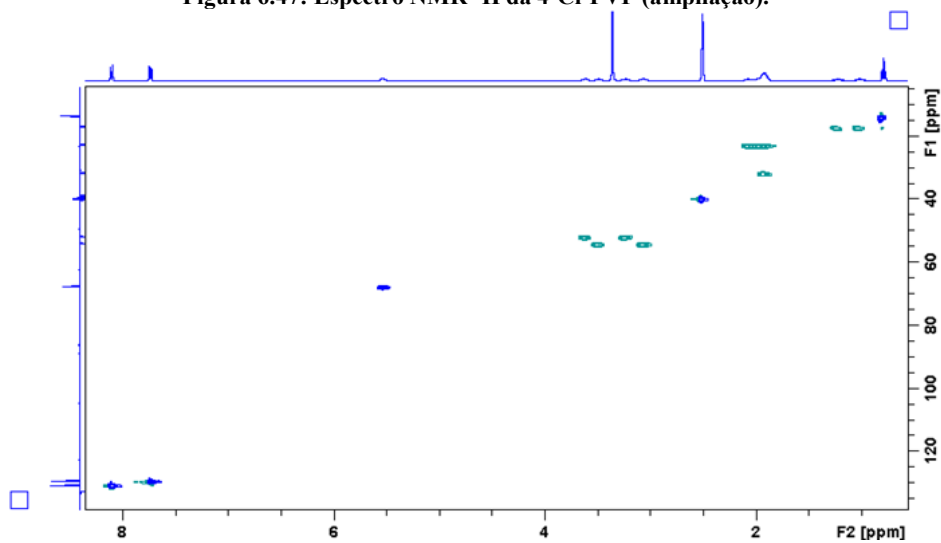


Figura 6.48: Espectro NMR HSQC editado da 4-Cl-PVP.

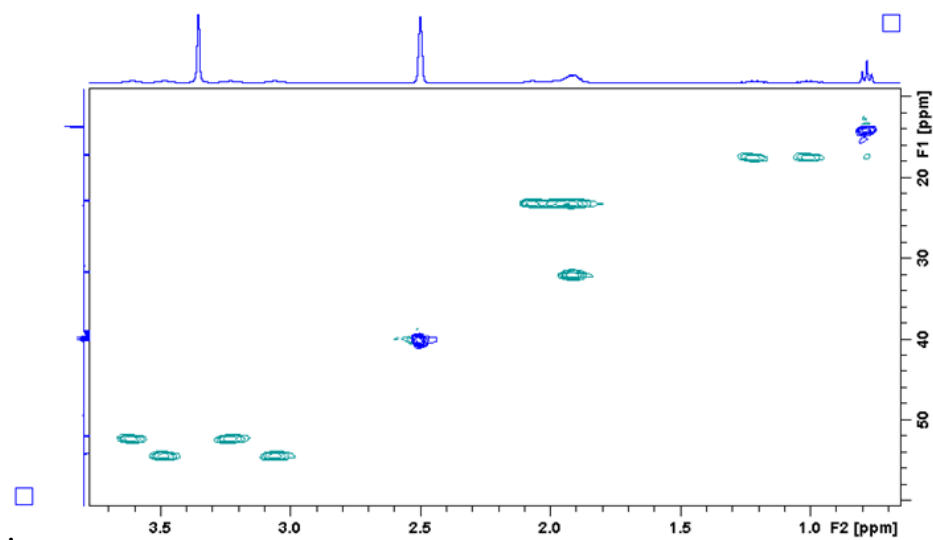


Figura 6.49: Espectro NMR HSQC editado da 4-Cl-PVP (ampliação).

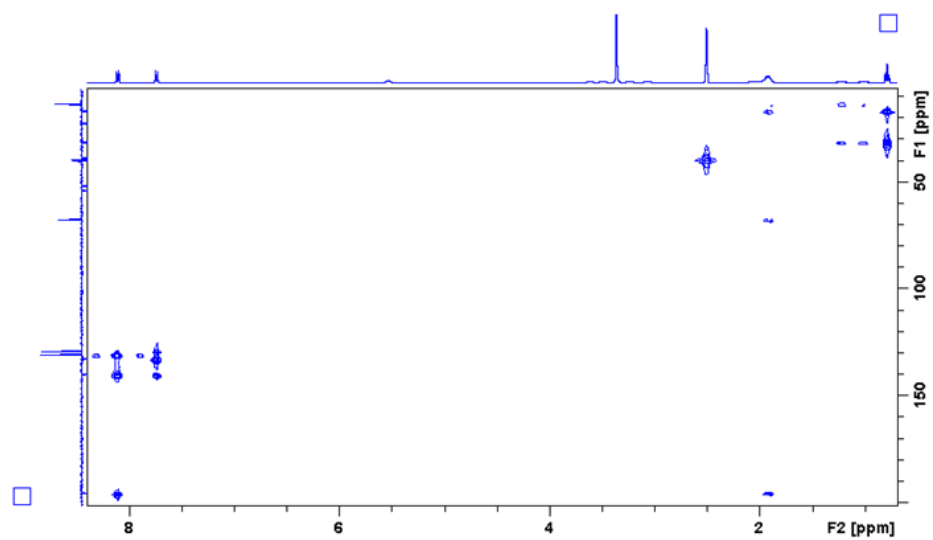


Figura 6.50: Espectro NMR HMBC da 4-Cl-PVP.

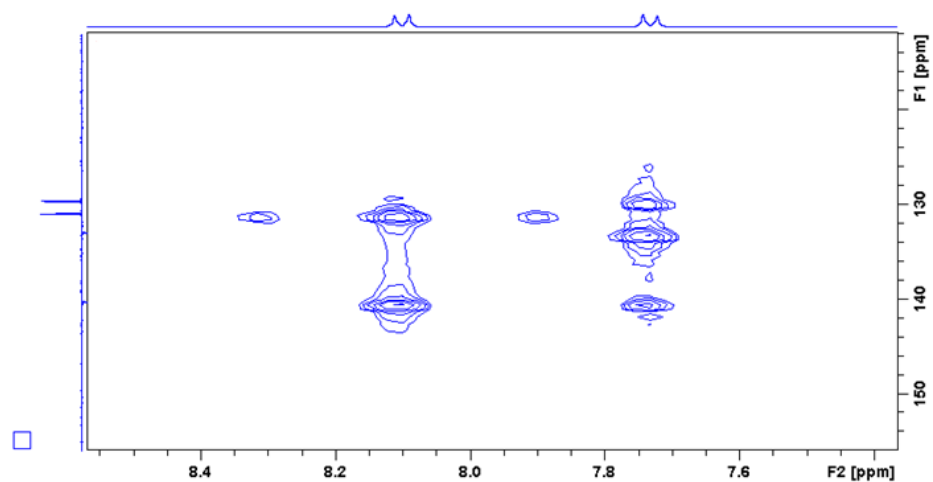


Figura 6.51: Espectro NMR HMBC da 4-Cl-PVP (ampliação).

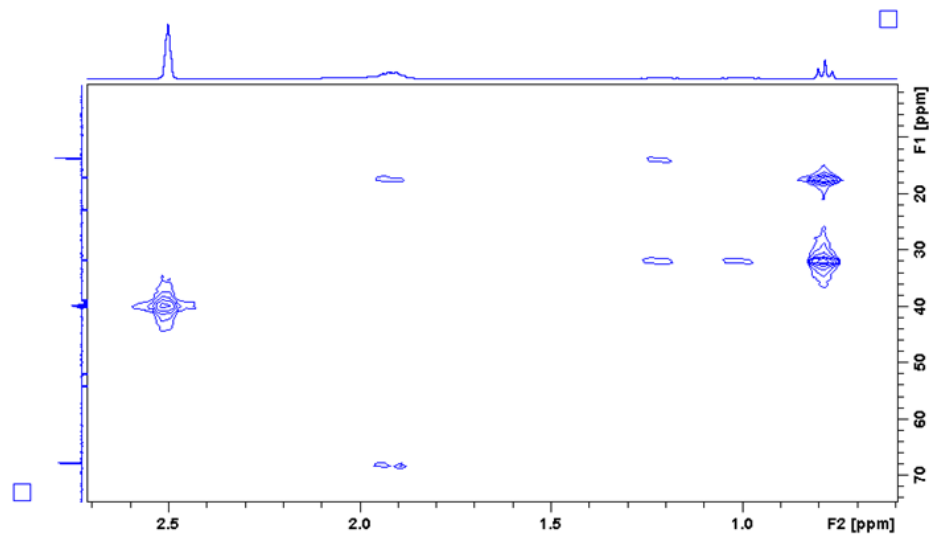


Figura 6.52: Espectro NMR HMBC da 4-Cl-PVP (ampliação).

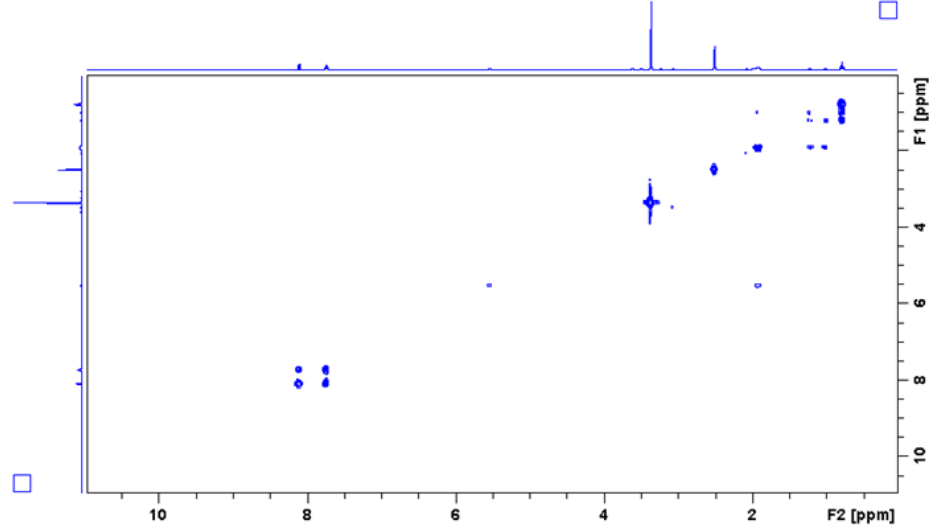


Figura 6.53: Espectro NMR COSY da 4-Cl-PVP.

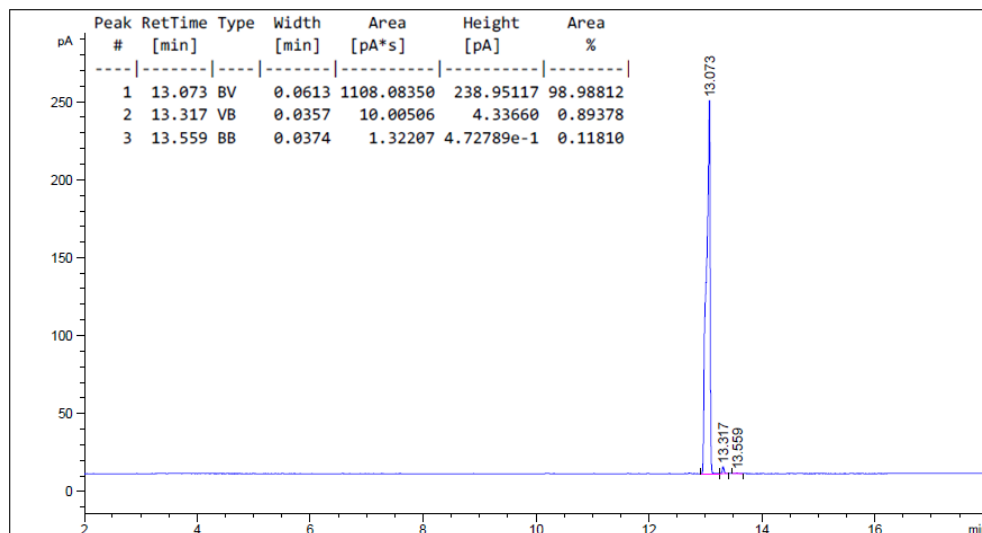


Figura 6.54: Cromatograma GC-FID da análise 2 da 4-Cl-PVP.

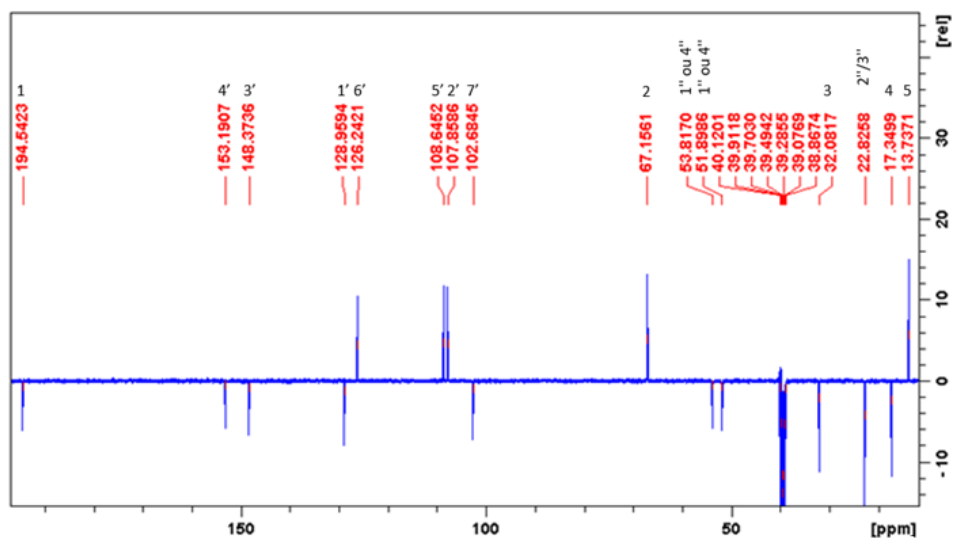


Figura 6.55: Espectro NMR  $^{13}\text{C}$  APT da MDPV.

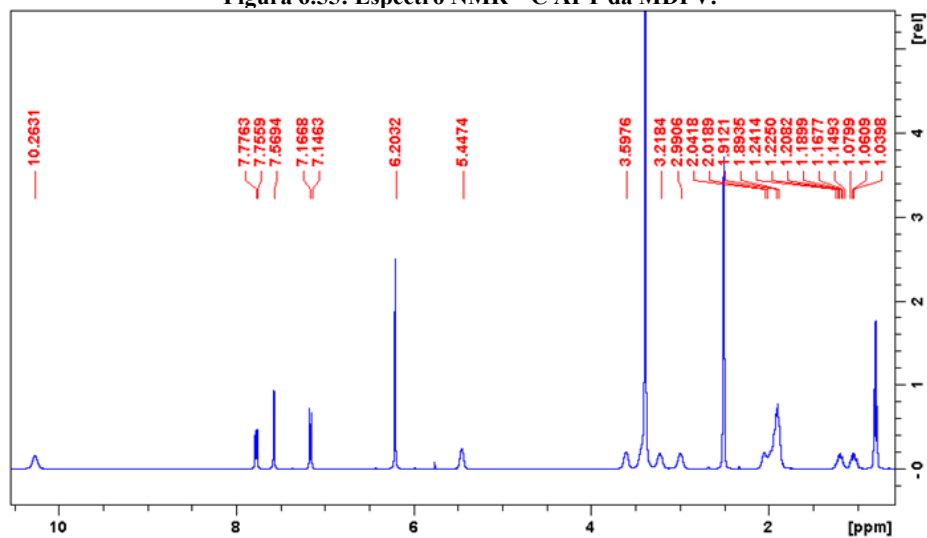


Figura 6.56: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da MDPV.

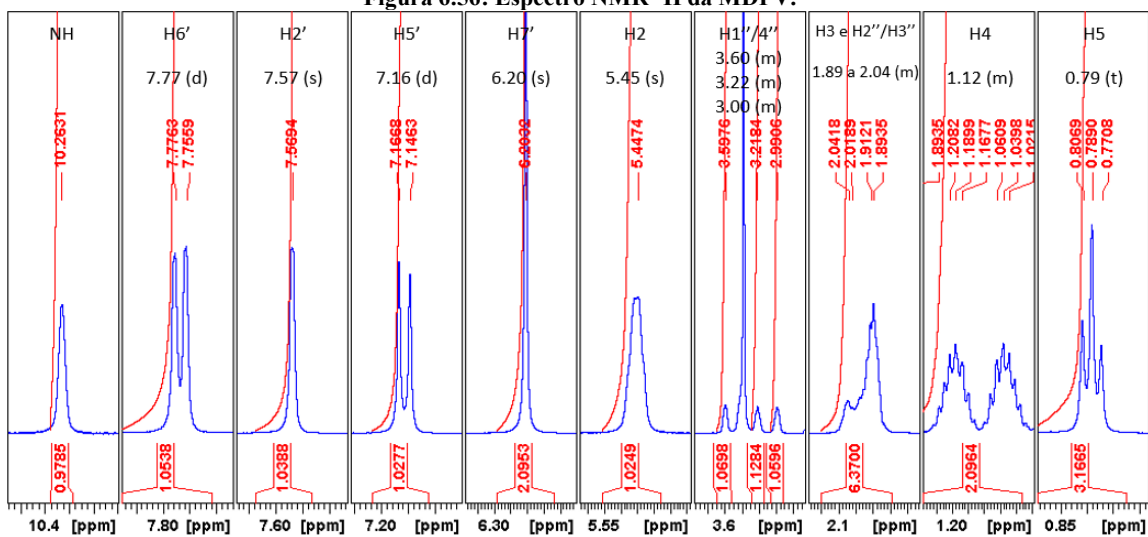


Figura 6.57: Espectro NMR  $^1\text{H}$  da MDPV (ampliação).

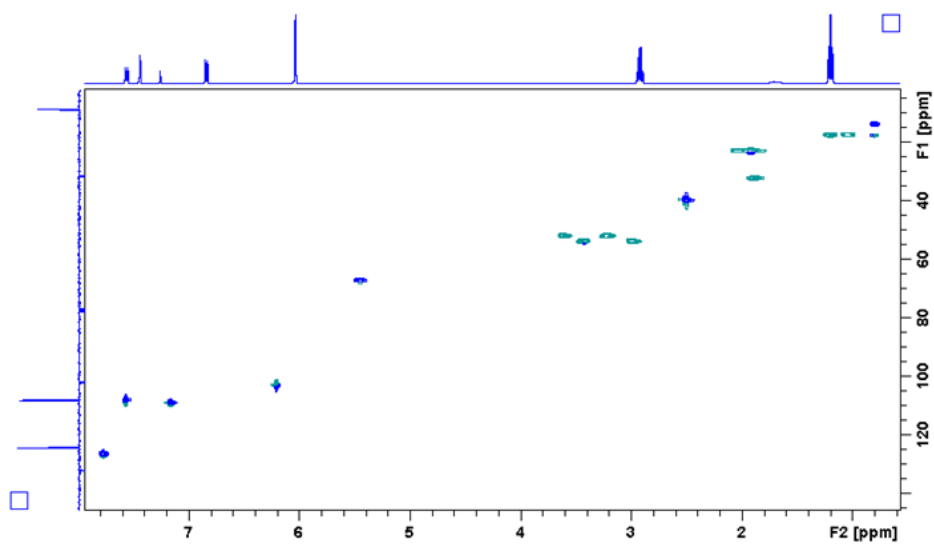


Figura 6.58: Espectro NMR HSQC editado da MDPV.

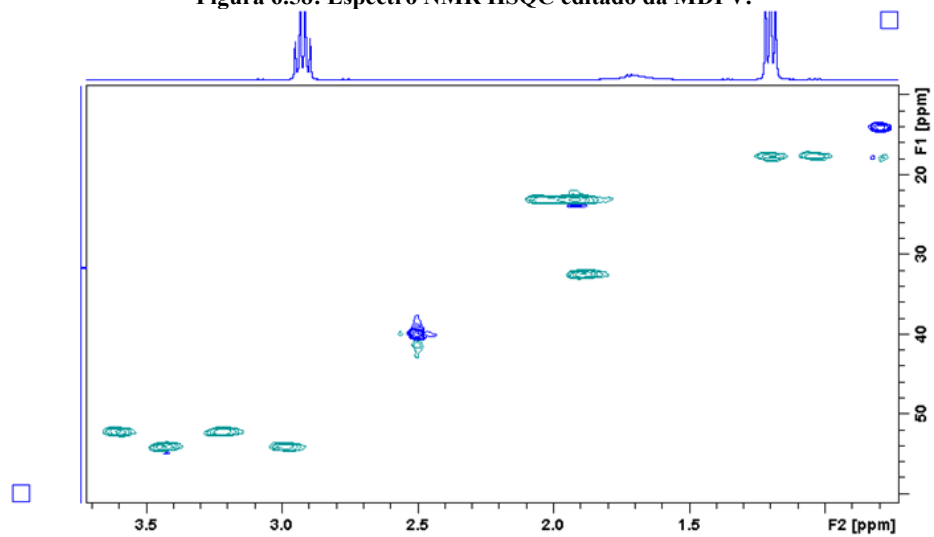


Figura 6.59: Espectro NMR HSQC editado da MDPV (ampliação).

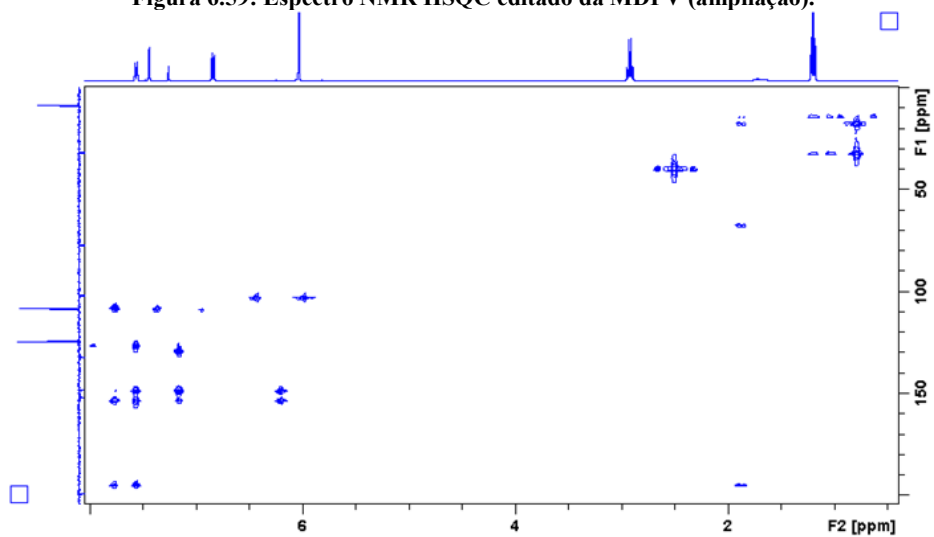


Figura 6.60: Espectro NMR HMBC da MDPV.



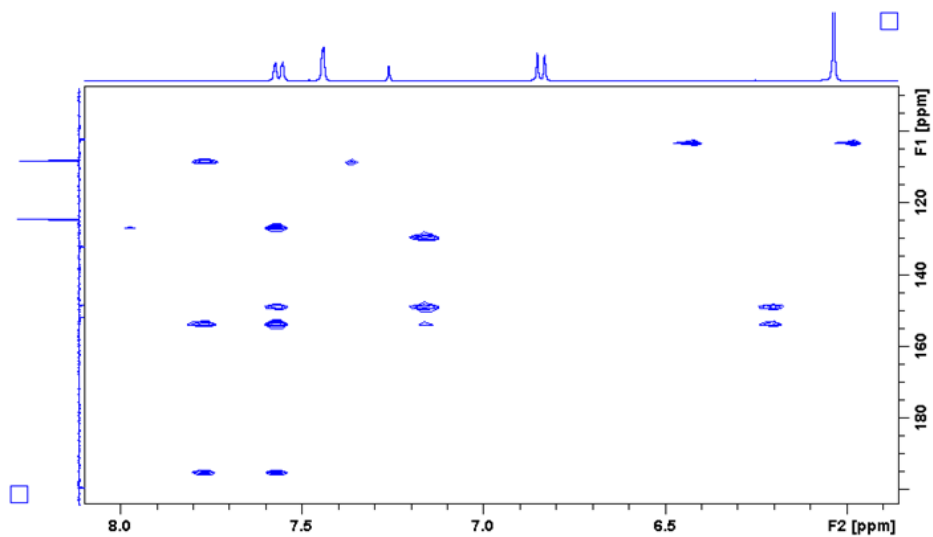


Figura 6.61: Espectro NMR HMBC da MDPV (ampliação).

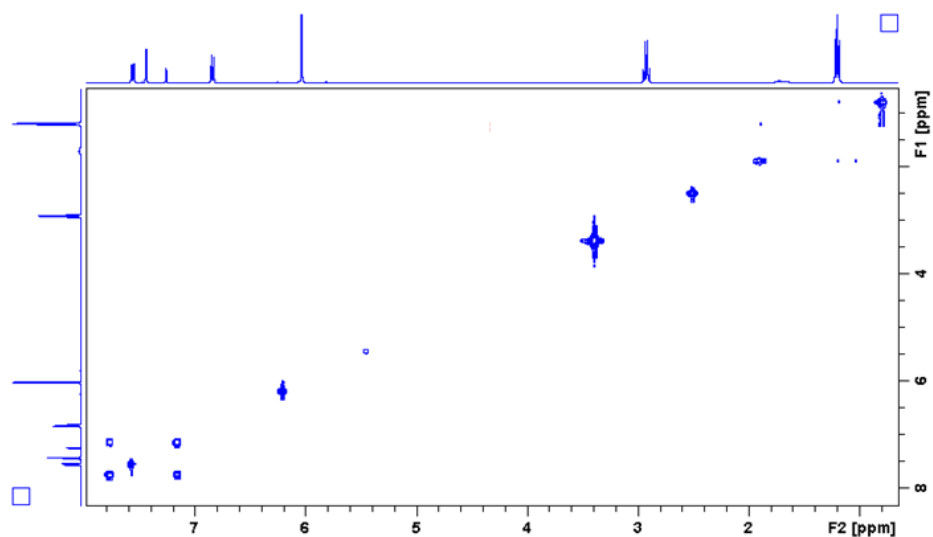


Figura 6.62: Espectro NMR COSY da MDPV.

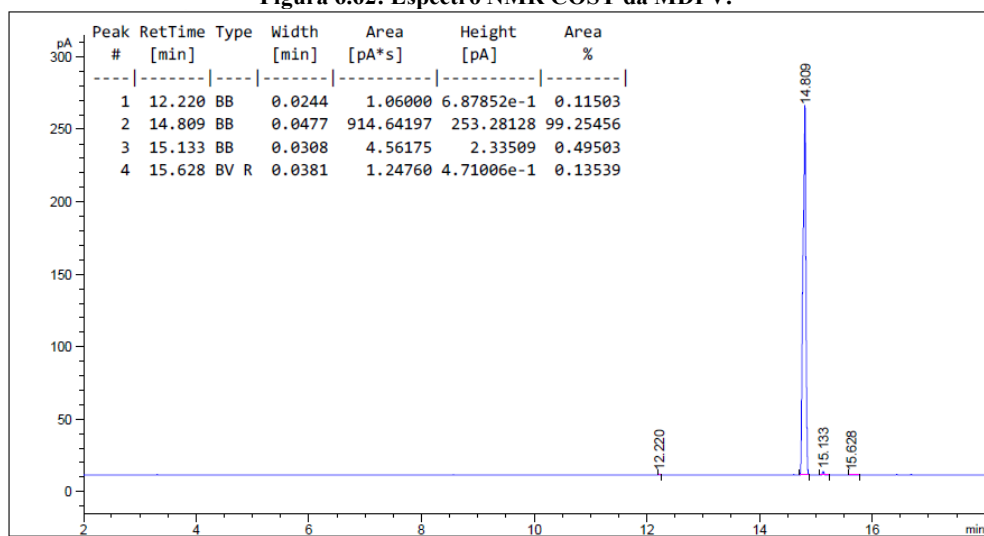


Figura 6.63: Cromatograma GC-FID da análise 3 da MDPV.

## Anexo C: Identificação dos Compostos

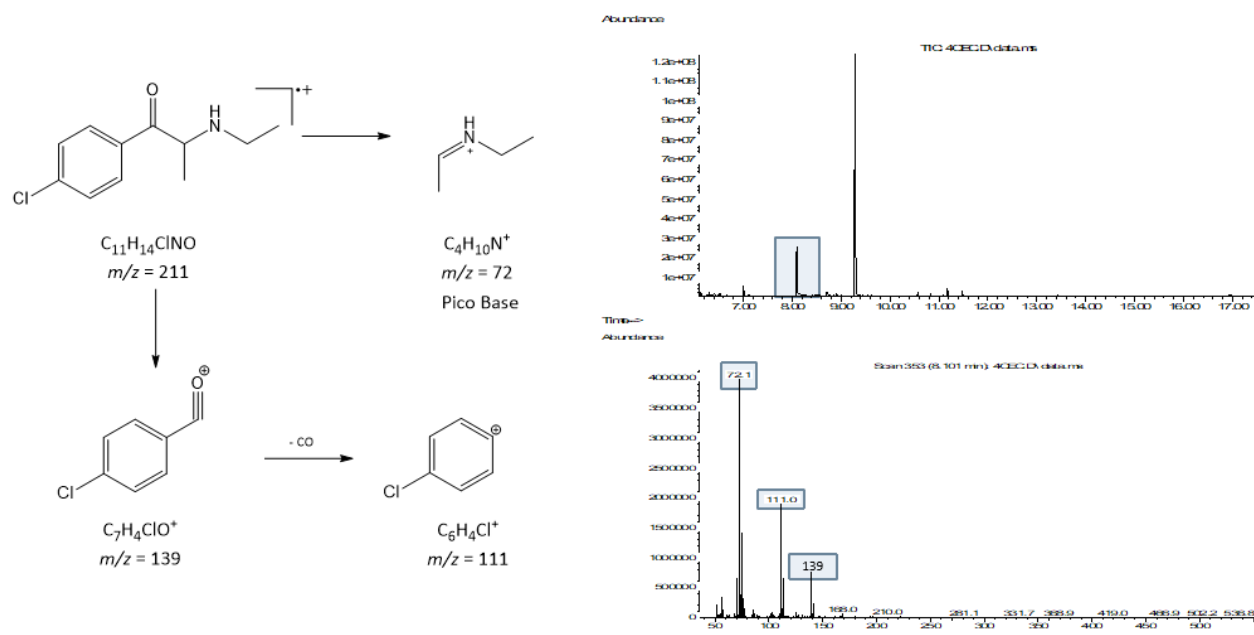


Figura 6.64: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-CEC.

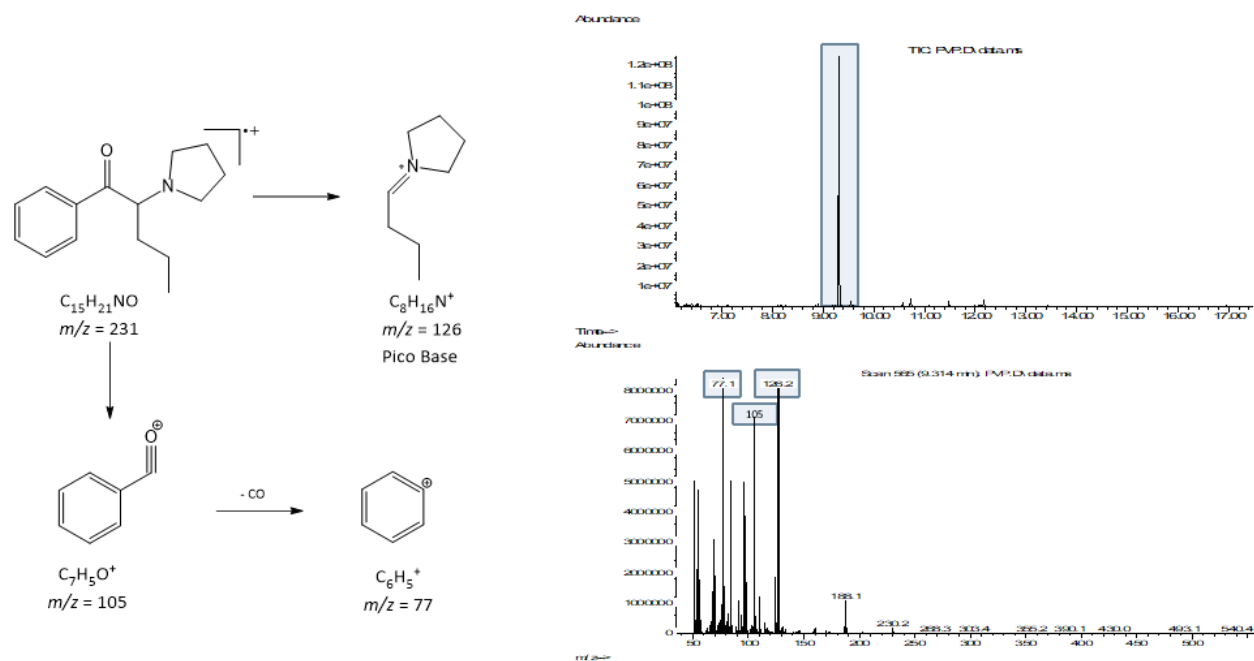


Figura 6.65: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da  $\alpha$ -PVP.

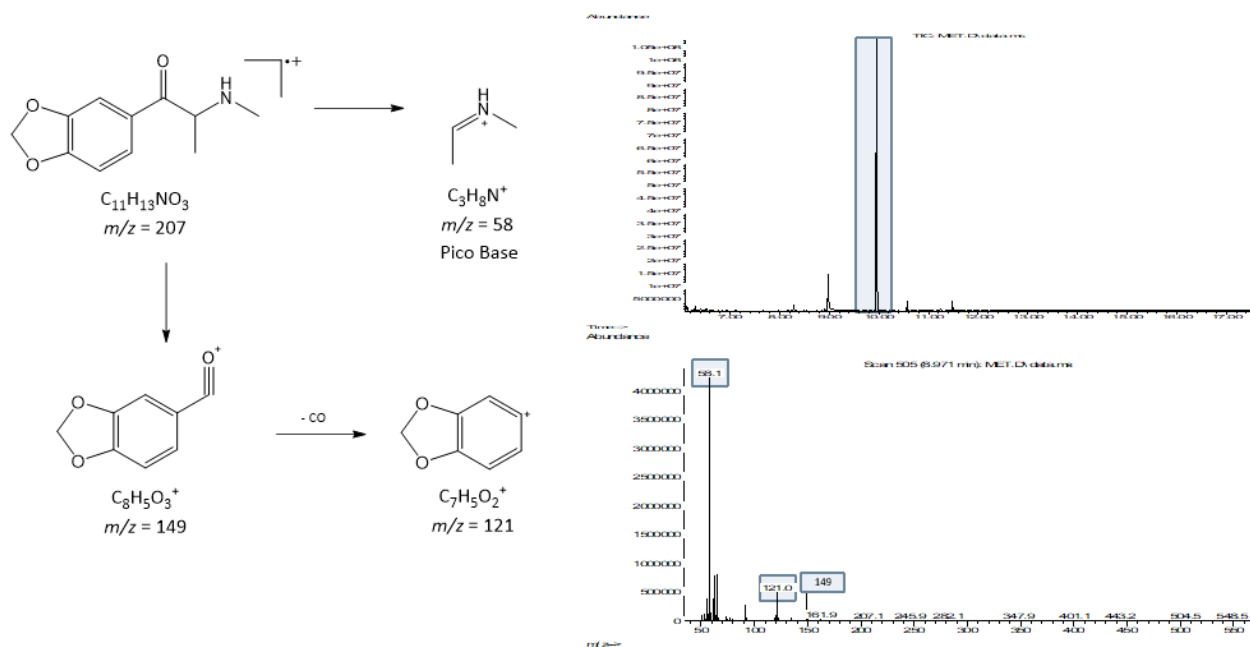


Figura 6.66: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da metilona.

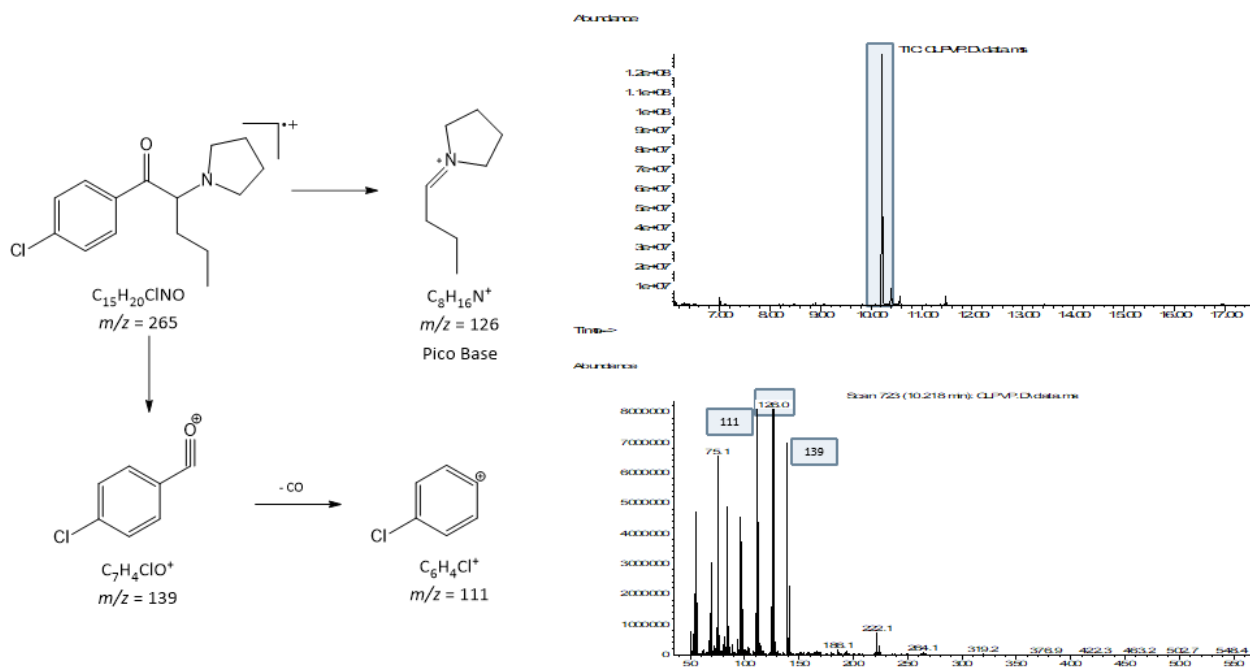


Figura 6.67: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-Cl-PVP.

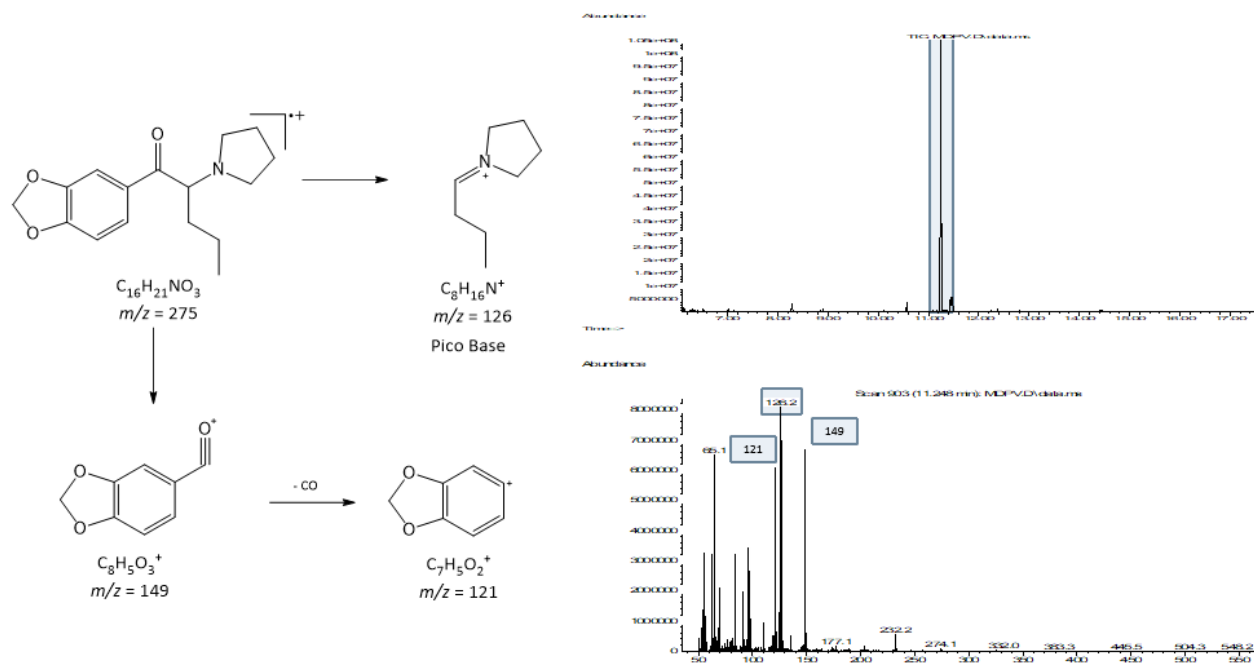


Figura 6.68: Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da MDPV.

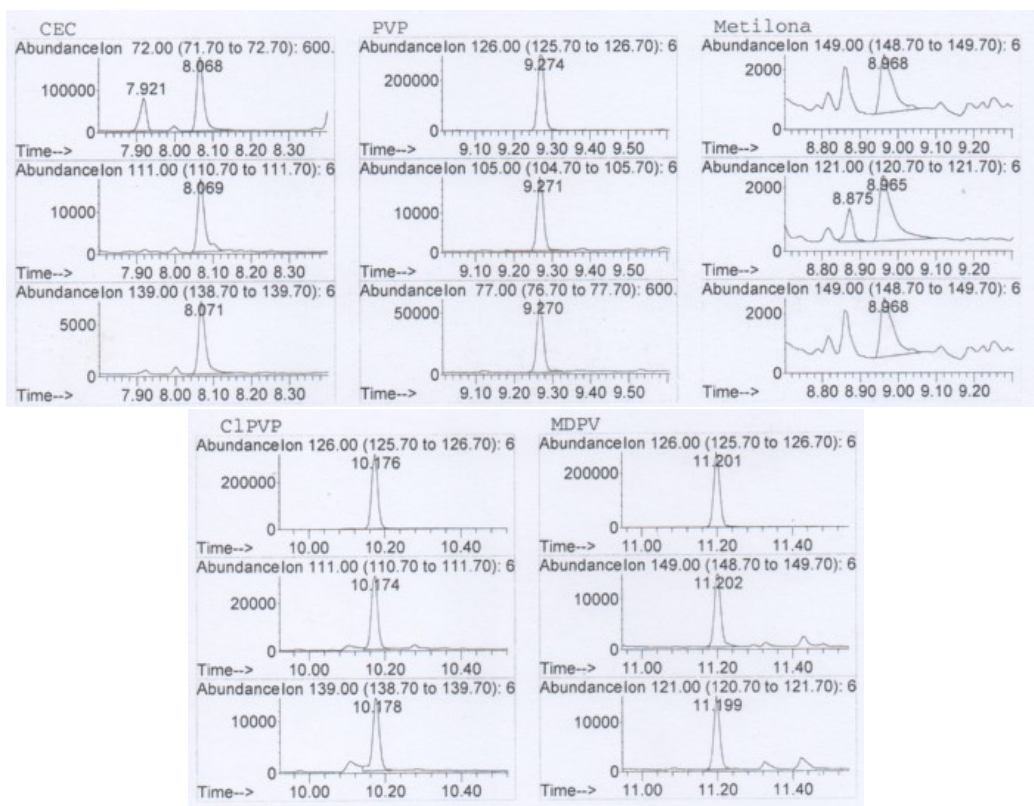



Figura 6.69: Cromatogramas obtidos no estudo da linearidade numa MACRO desenvolvida internamente (600 ng/mL).



**INML, IP • SUL**

TOXICOLOGIA FORENSE

**REGISTO**


Pág. 1/1

**Confirmação Qualitativa**

Amostra:	25 ng/mL	Padrão Interno:	BE-D3	Operador:	MA
Substância:	4-CEC	Controlo:	800 ng/mL	Data:	13/3/2018
Observações:					

Controlo: 800 ng/mL	Isó	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º isó	72	234938	100.0%			
2º isó	111	232770	9.9%	5 abs.	4.3%	14.3%
3º isó	139	89648	3.8%	50% rel.	1.3%	5.7%
4º isó						
4-CEC (t.r.) *	8.06			0.1 abs.	7.364	8.764
BE-D3 (t.r.) *	11.88	t.r. *	0.679	t.r. rel.	0.672	0.686

Amostra: 25 ng/mL	Isó	Área	Área relativa	Conformidade
1º isó	72	85245	100.0%	conforme
2º isó	111	8737	10.3%	conforme
3º isó	139	5006	5.6%	conforme
4º isó				
4-CEC (t.r.) *	8.07			conforme
BE-D3 (t.r.) *	11.88	t.r. *	0.680	conforme



**INML, IP • SUL**

TOXICOLOGIA FORENSE

**REGISTO**


Pág. 1/1

**Confirmação Qualitativa**

Amostra:	25 ng/mL	Padrão Interno:	BE-D3	Operador:	MA
Substância:	4-Cl-PVP	Controlo:	800 ng/mL	Data:	13/3/2018
Observações:					

Controlo: 800 ng/mL	Isó	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º isó	126	3632164	100.0%			
2º isó	111	376422	10.2%	5 abs.	5.2%	15.2%
3º isó	139	169546	4.6%	50% rel.	2.3%	6.3%
4º isó						
4-Cl-PVP (t.r.) *	10.17			0.1 abs.	10.073	10.273
BE-D3 (t.r.) *	11.88	t.r. *	0.857	t.r. rel.	0.848	0.865

Amostra: 25 ng/mL	Isó	Área	Área relativa	Conformidade
1º isó	126	151523	100.0%	conforme
2º isó	111	14648	11.3%	conforme
3º isó	139	3945	3.0%	conforme
4º isó				
4-Cl-PVP (t.r.) *	10.17			conforme
BE-D3 (t.r.) *	11.88	t.r. *	0.857	conforme



**INML, IP • SUL**

TOXICOLOGIA FORENSE

**REGISTO**


Pág. 1/1

**Confirmação Qualitativa**

Amostra:	25 ng/mL	Padrão Interno:	COCAÍNA-D3	Operador:	MA
Substância:	α-PVP	Controlo:	800 ng/mL	Data:	13/3/2018
Observações:					

Controlo: 800 ng/mL	Isó	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º isó	126	3887766	100.0%			
2º isó	105	235091	6.0%	5 abs.	1.0%	11.0%
3º isó	77	755310	19.4%	5 abs.	14.4%	24.4%
4º isó						
α-PVP (t.r.) *	3.27			0.1 abs.	3.170	3.370
COCAÍNA-D3 (t.r.) *	11.58	t.r. *	0.800	t.r. rel.	0.792	0.808

Amostra: 25 ng/mL	Isó	Área	Área relativa	Conformidade
1º isó	126	123242	100.0%	conforme
2º isó	105	13595	10.5%	conforme
3º isó	77	25051	19.4%	conforme
4º isó				
α-PVP (t.r.) *	3.27			conforme
COCAÍNA-D3 (t.r.) *	11.58	t.r. *	0.801	conforme



**INML, IP • SUL**

TOXICOLOGIA FORENSE

**REGISTO**

Pág. 1/1

**Confirmação Qualitativa**

Amostra:	25 ng/mL	Padrão Interno:	COCAÍNA-D3	Operador:	MA
Substância:	MDPV	Controlo:	800 ng/mL	Data:	13/3/2018
Observações:					

Controlo: 800 ng/mL	Isó	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º isó	126	3237334	100.0%			
2º isó	143	187102	5.8%	5 abs.	1.0%	11.0%
3º isó	121	185040	5.6%	5 abs.	0.6%	10.6%
4º isó						
MDPV (t.r.) *	11.20			0.1 abs.	11.038	11.298
COCAÍNA-D3 (t.r.) *	11.58	t.r. *	0.967	t.r. rel.	0.957	0.976

Amostra: 25 ng/mL	Isó	Área	Área relativa	Conformidade
1º isó	126	114245	100.0%	conforme
2º isó	143	12436	10.9%	conforme
3º isó	121	3306	6.1%	conforme
4º isó				
MDPV (t.r.) *	11.20			conforme
COCAÍNA-D3 (t.r.) *	11.58	t.r. *	0.967	conforme

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	t.r.

Controlo	Área
4-CEC	85245
BE-D3	204274
(ng/mL)	800

n.º Isó:	1
----------	---

Amostra	Área
4-CEC	85245
BE-D3	194708
(ng/mL)	33,60

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	t.r.

Controlo	Área
4-Cl-PVP	3632164
BE-D3	204274
(ng/mL)	800

n.º Isó:	1
----------	---

Amostra	Área
4-Cl-PVP	151523
BE-D3	194708
(ng/mL)	31,52

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	t.r.

Controlo	Área
α-PVP	3887766
COCAÍNA-D3	511761
(ng/mL)	800

n.º Isó:	1
----------	---

Amostra	Área
α-PVP	123242
COCAÍNA-D3	524845
(ng/mL)	25,33

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	t.r.

Controlo	Área
MDPV	3237334
COCAÍNA-D3	511761
(ng/mL)	800

n.º Isó:	1
----------	---

Amostra	Área
MDPV	114245
COCAÍNA-D3	524845
(ng/mL)	27,03

Figura 6.70: Folha de cálculo usada no SQTF do INMLCF para confirmação qualitativa dos compostos em estudo (por ordem: 4-CEC, α-PVP, 4-Cl-PVP e MDPV).

## Anexo D: Escolha do Padrão Interno

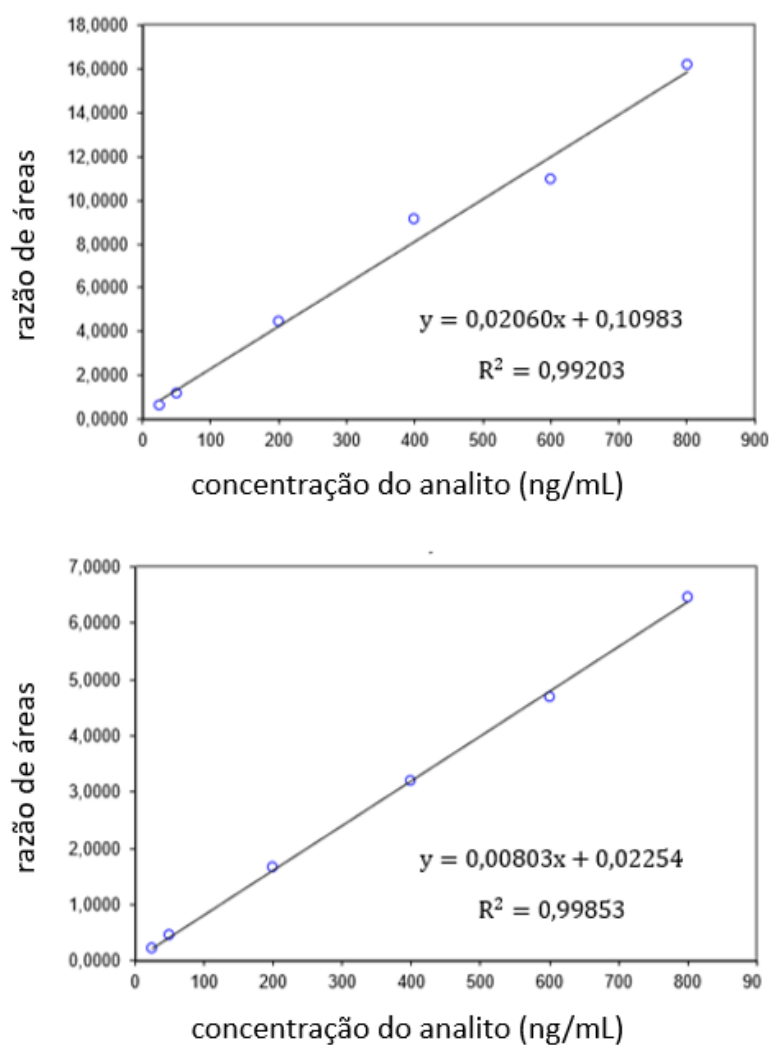


Figura 6.71: Comparação das curvas de calibração da molécula de MDPV usando como padrão interno benzoilecgonina-d<sub>3</sub> (em cima) e cocaína-d<sub>3</sub> (em baixo).

## Anexo E: Derivatização Química

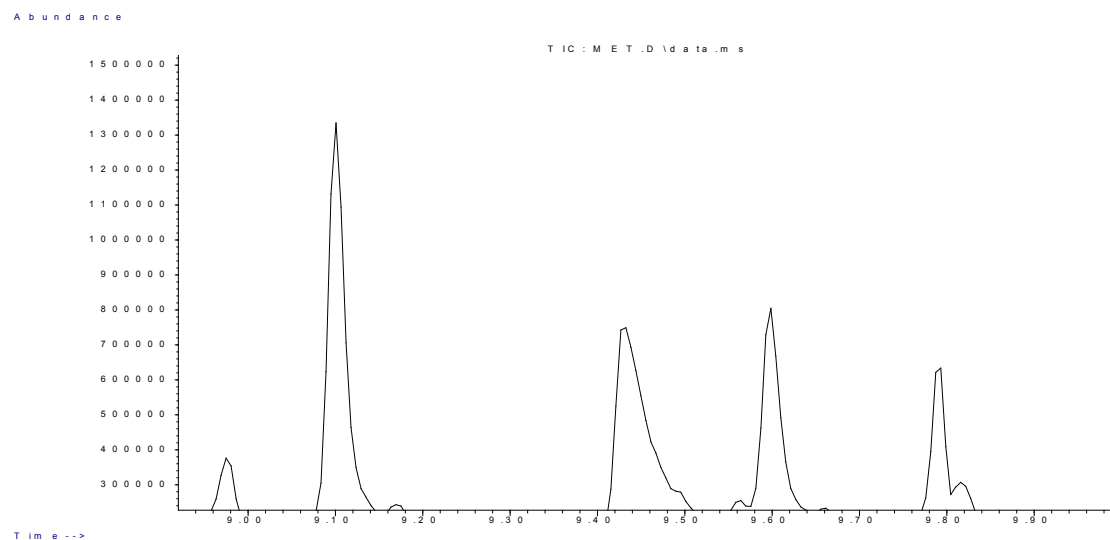


Figura 6.72: Cromatograma da mistura de cationonas usando como reagente de derivatização MBTFA.

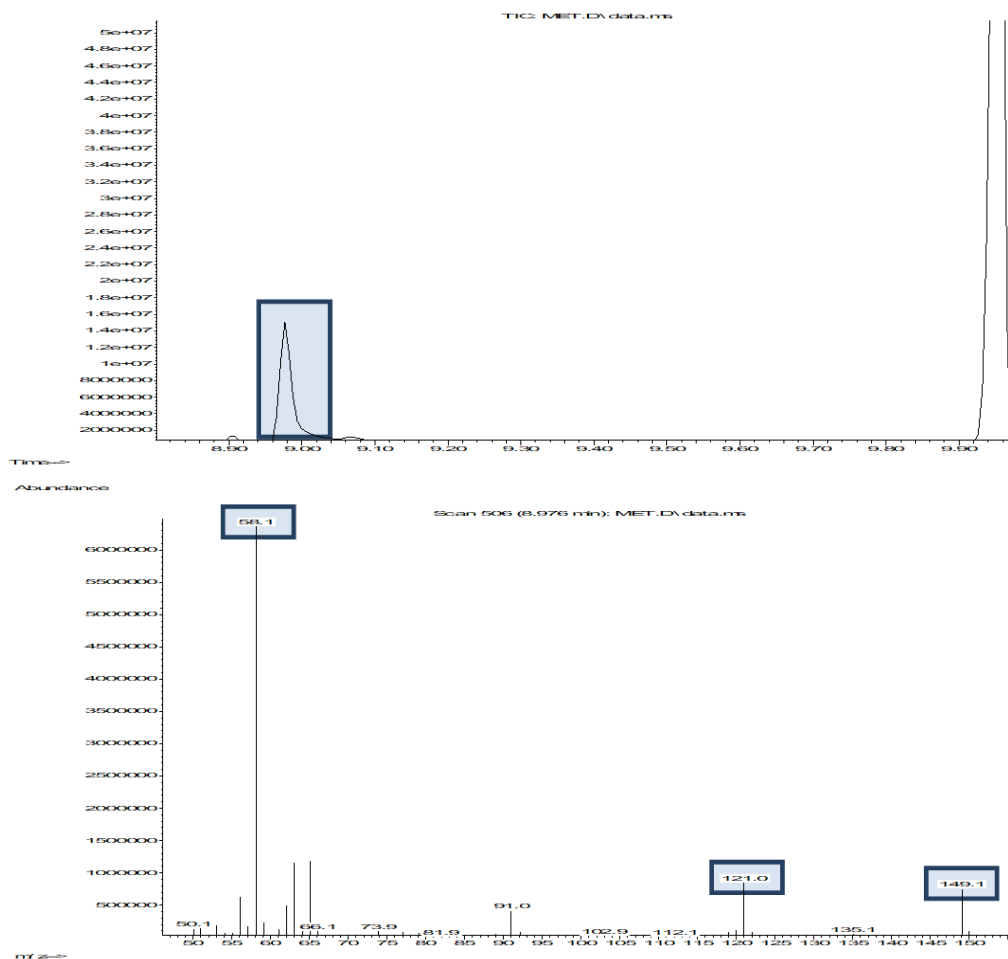


Figura 6.73: Cromatograma (em cima) e espectro de massa (em baixo) da molécula de metilona na mistura de cationonas usando como reagente de derivatização MSTFA:TMCS (95;5, v/v).

## Anexo F: Metodologia de Extração em Fase Sólida



Figura 6.74: Comparação dos cromatogramas obtidos das amostras 1 (Oasis® MCX), 5, 7, 9 e 11 (Oasis® HLB).

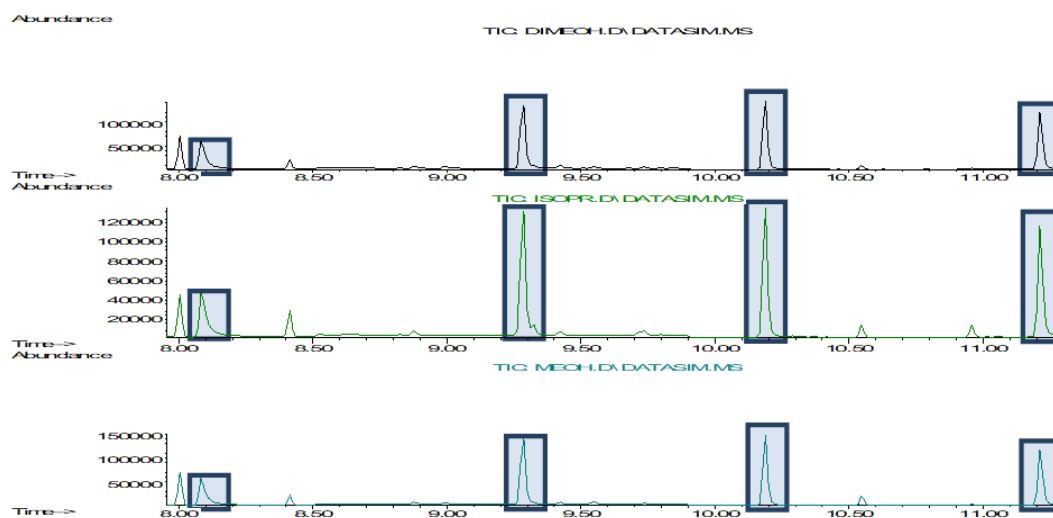


Figura 6.75: Cromatogramas obtidos usando como eluente diclorometano:metanol (70:30, v/v), isopropanol e metanol.



## Anexo G: Avaliação da Seletividade

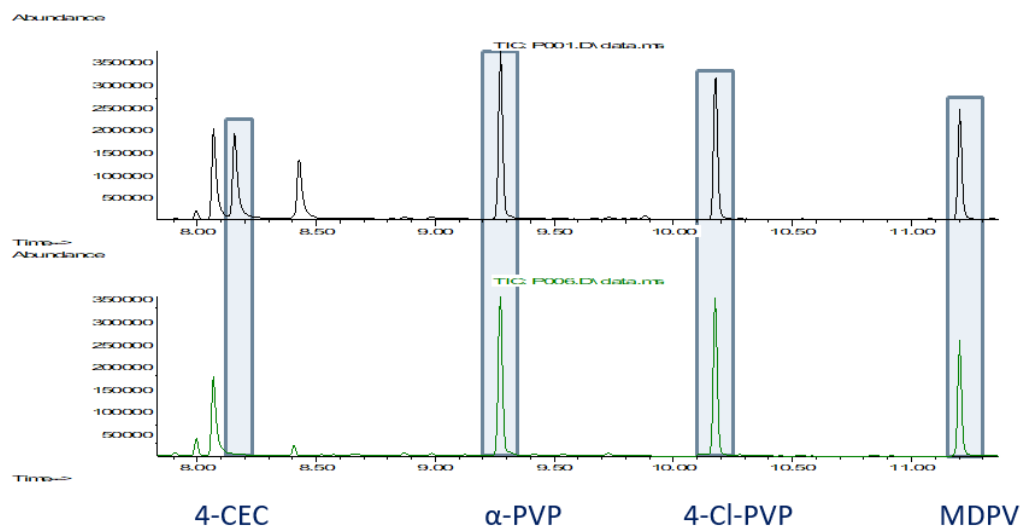


Figura 6.76: Cromatograma obtido por SPE/GC-MS da amostra 1 (cima) e da amostra 6 (baixo).

## Anexo H: Linearidade e Modelo de Calibração

**Tabela 6.1: Valores da interseção, do declive, do coeficiente de correlação e do coeficiente de determinação obtidos nos cinco dias do estudo da linearidade.**

Catinona	Ião ( $m/z$ )	Dia do Estudo da Linearidade	Interseção	Declive	r	R <sup>2</sup>
4-CEC	72	Dia 1	- 0,0170	0,0054	0,9974	0,9948
		Dia 2	- 0,0089	0,0047	0,9987	0,9974
		Dia 3	- 0,0308	0,0047	0,9971	0,9942
		Dia 4	- 0,0801	0,0057	0,9982	0,9968
		Dia 5	- 0,0282	0,0051	0,9984	0,9968
$\alpha$ -PVP	126	Dia 1	0,0283	0,0092	0,9987	0,9974
		Dia 2	0,0220	0,0083	0,9982	0,9965
		Dia 3	- 0,0121	0,0087	0,9992	0,9985
		Dia 4	- 0,0386	0,0095	0,9992	0,9983
		Dia 5	0,0490	0,0090	0,9971	0,9942
4-Cl-PVP	126	Dia 1	0,0381	0,0089	0,9984	0,9967
		Dia 2	0,0324	0,0081	0,9982	0,9963
		Dia 3	- 0,0009	0,0084	0,9989	0,9979
		Dia 4	- 0,0145	0,0088	0,9989	0,9978
		Dia 5	0,0514	0,0081	0,9959	0,9918
MDPV	126	Dia 1	0,0225	0,0080	0,9985	0,9985
		Dia 2	- 0,0204	0,0075	0,9984	0,9967
		Dia 3	- 0,0262	0,0073	0,9990	0,9980
		Dia 4	0,0189	0,0077	0,9984	0,9968
		Dia 5	0,0138	0,0074	0,9987	0,9973

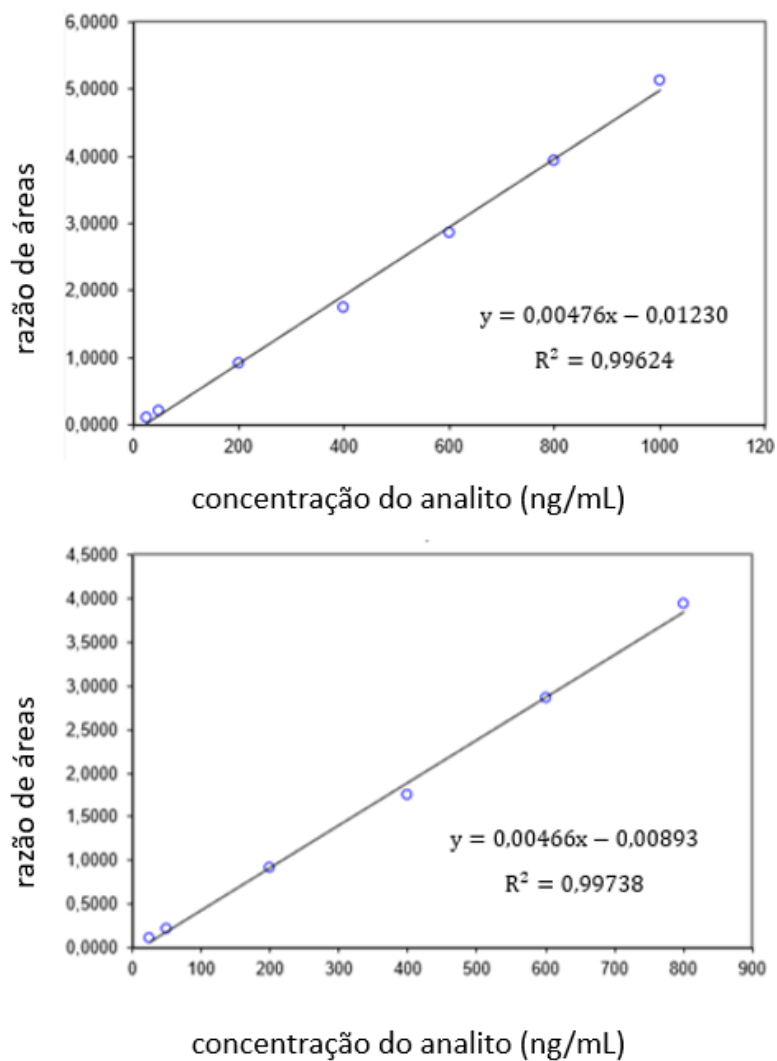


Figura 6.77: Comparação das curvas de calibração da molécula de 4-CEC usando sete calibradores (25, 50, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/mL, em cima) e usando seis calibradores (25, 50, 200, 400, 600, 800 ng/mL, em baixo)

## Anexo I: Limites de Detecção

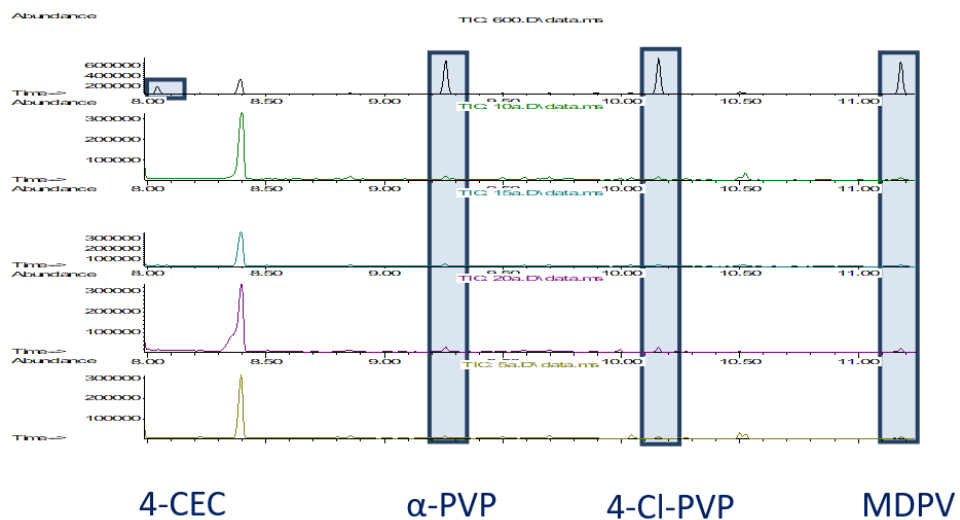



Figura 6.78: Comparação dos cromatogramas obtidos a 600 ng/mL e a 5, 10, 15 e 20 ng/mL.



INML, IP • SUL

TOXICOLOGIA FORENSE

REGISTO

Pág. 1/1

Confirmação Qualitativa

Amostra: **5e**

Substância: **α-PVP**

Observações:

Padrão Interno: COCAÍNA-D3


Controlo: 600 ng/mL

Operador: MA

Data: 24/4/2018

Controlo: 600 ng/mL	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º lã	126	1870131	100,0%			
2º lã	105	162151	8,7%	5 abs.	3,7%	13,7%
3º lã	77	468473	25,0%	20% rel.	20,0%	30,1%
4º lã						
α-PVP (t.r.) =	9,43			0,1 abs.	9,328	9,528
COCAÍNA-D3 (t.r.) =	11,73	t.r.r. =	0,803	1% rel.	0,795	0,812

Amostra: 5e	lão	Área	Área relativa	Conformidade
1º lã	126	14189	100,0%	conforme
2º lã	105	1692	11,9%	conforme
3º lã	77	3791	26,7%	conforme
4º lã				
α-PVP (t.r.) =	9,43			conforme
COCAÍNA-D3 (t.r.) =	11,73	t.r.r. =	0,804	conforme



INML, IP • SUL

TOXICOLOGIA FORENSE

REGISTO

Pág. 1/1

Confirmação Qualitativa

Amostra: **5b**

Substância: **4-Cl-PVP**

Observações:

Padrão Interno: COCAÍNA-D3


Controlo: 600 ng/mL

Operador: MA

Data: 24/4/2018

Controlo: 600 ng/mL	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º lã	126	2111374	100,0%			
2º lã	111	402277	19,1%	5 abs.	14,1%	24,1%
3º lã	139	186226	8,8%	5 abs.	3,8%	13,8%
4º lã						
4-Cl-PVP (t.r.) =	10,33			0,1 abs.	10,228	10,428
COCAÍNA-D3 (t.r.) =	11,73	t.r.r. =	0,880	1% rel.	0,871	0,889

Amostra: 5b	lão	Área	Área relativa	Conformidade
1º lã	126	16022	100,0%	conforme
2º lã	111	3780	23,6%	conforme
3º lã	139	1826	11,4%	conforme
4º lã				
4-Cl-PVP (t.r.) =	10,33			conforme
COCAÍNA-D3 (t.r.) =	11,74	t.r.r. =	0,880	conforme



INML, IP • SUL

TOXICOLOGIA FORENSE

REGISTO

Pág. 1/1

Confirmação Qualitativa

Amostra: **5a**

Substância: **MDPV**

Observações:

Padrão Interno: COCAÍNA-D3


Controlo: 600 ng/mL

Operador: MA

Data: 24/4/2018

Controlo: 600 ng/mL	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º lã	126	1934908	100,0%			
2º lã	149	185004	9,3%	5 abs.	4,3%	14,3%
3º lã	121	176781	8,9%	5 abs.	3,9%	13,9%
4º lã						
MDPV (t.r.) =	11,35			0,1 abs.	11,250	11,450
COCAÍNA-D3 (t.r.) =	11,73	t.r.r. =	0,967	1% rel.	0,958	0,977

Amostra: 5a	lão	Área	Área relativa	Conformidade
1º lã	126	13185	100,0%	conforme
2º lã	149	1633	8,5%	conforme
3º lã	121	972	5,1%	conforme
4º lã				
MDPV (t.r.) =	11,35			conforme
COCAÍNA-D3 (t.r.) =	11,74	t.r.r. =	0,967	conforme



INML, IP • SUL

TOXICOLOGIA FORENSE

REGISTO

Pág. 1/1

Confirmação Qualitativa

Amostra: **5c**

Substância: **MDPV**

Observações:

Padrão Interno: COCAÍNA-D3


Controlo: 600 ng/mL

Operador: MA

Data: 24/4/2018

Controlo: 600 ng/mL	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º lã	126	1870131	100,0%			
2º lã	105	162151	8,7%	5 abs.	3,7%	13,7%
3º lã	77	468473	25,0%	20% rel.	20,0%	30,1%
4º lã						
MDPV (t.r.) =	9,43			0,1 abs.	9,328	9,528
COCAÍNA-D3 (t.r.) =	11,73	t.r.r. =	0,803	1% rel.	0,795	0,812

Amostra: 5c	lão	Área	Área relativa	Conformidade
1º lã	126	14189	100,0%	conforme
2º lã	105	1692	11,9%	conforme
3º lã	77	3791	26,7%	conforme
4º lã				
MDPV (t.r.) =	9,43			conforme
COCAÍNA-D3 (t.r.) =	11,73	t.r.r. =	0,804	conforme



INML, IP • SUL

TOXICOLOGIA FORENSE

REGISTO

Pág. 1/1

Confirmação Qualitativa

> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	1%

Controlo	Área
α-PVP	1870131
COCAÍNA-D3	640445
(ng/mL)	600

n.º lã: 1

Amostra	Área
α-PVP	14189
COCAÍNA-D3	548635
(ng/mL)	5,31

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	1%

Controlo	Área
4-Cl-PVP	2111374
COCAÍNA-D3	640445
(ng/mL)	600

n.º lã: 1

Amostra	Área
4-Cl-PVP	16022
COCAÍNA-D3	571828
(ng/mL)	5,10

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	1%

Controlo	Área
MDPV	1934908
COCAÍNA-D3	640445
(ng/mL)	600

n.º lã: 1

Amostra	Área
MDPV	13185
COCAÍNA-D3	663104
(ng/mL)	5,57

Figura 6.79: Folhas de cálculo usadas para confirmação qualitativa dos compostos em estudo numa concentração de 5 ng/mL (por ordem, α-PVP, 4-Cl-PVP e MDPV).

## Anexo J: Estabilidade

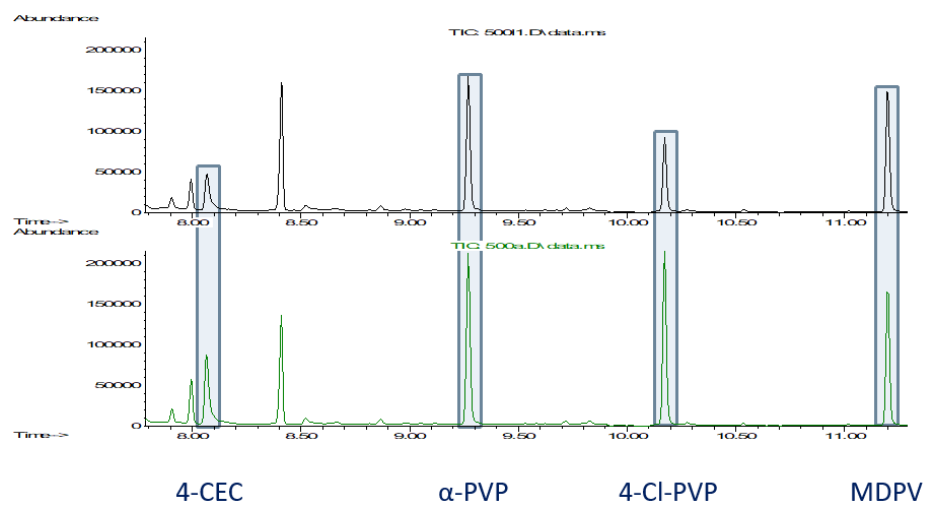


Figura 6.80: Comparação dos cromatogramas obtidos nas soluções fortificadas deixadas à temperatura ambiente de um dia para o outro (cima) com uma análise realizada no mesmo dia, ambas com uma concentração de 500 ng/mL.

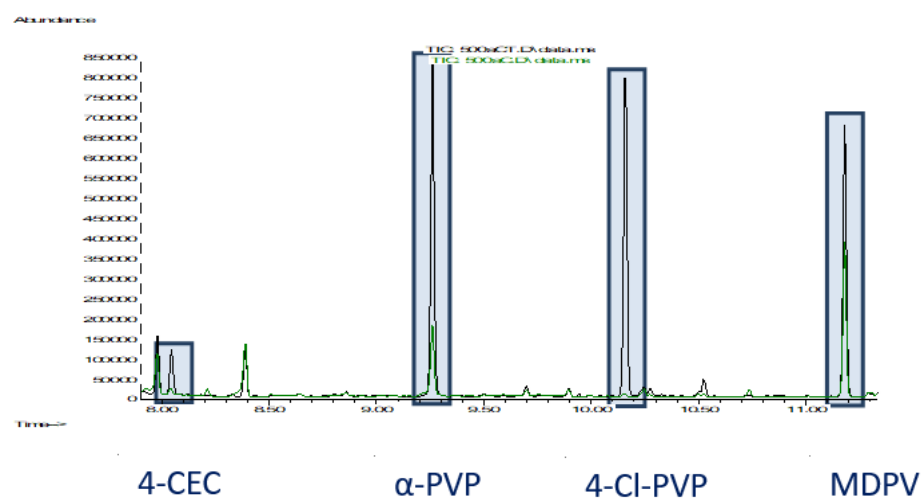
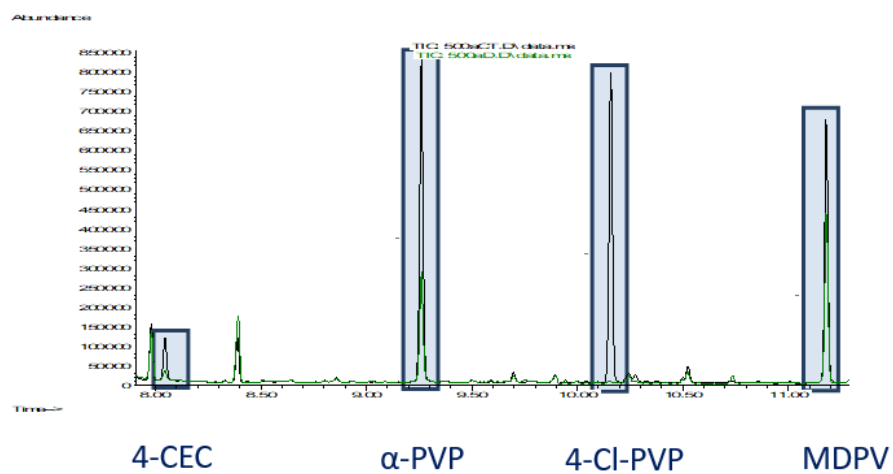


Figura 6.81: Comparação dos cromatogramas obtidos nas soluções fortificadas deixadas no congelador durante três meses com uma análise realizada no mesmo dia, ambas com uma concentração de 500 ng/mL.



**Figura 6.82:** Comparação dos cromatogramas obtidos nas soluções fortificadas deixadas no congelador durante três meses, tendo sido descongeladas e voltadas a congelar várias vezes com uma análise realizada no mesmo dia, ambas com uma concentração de 500 ng/mL.

## Anexo L: Recuperação

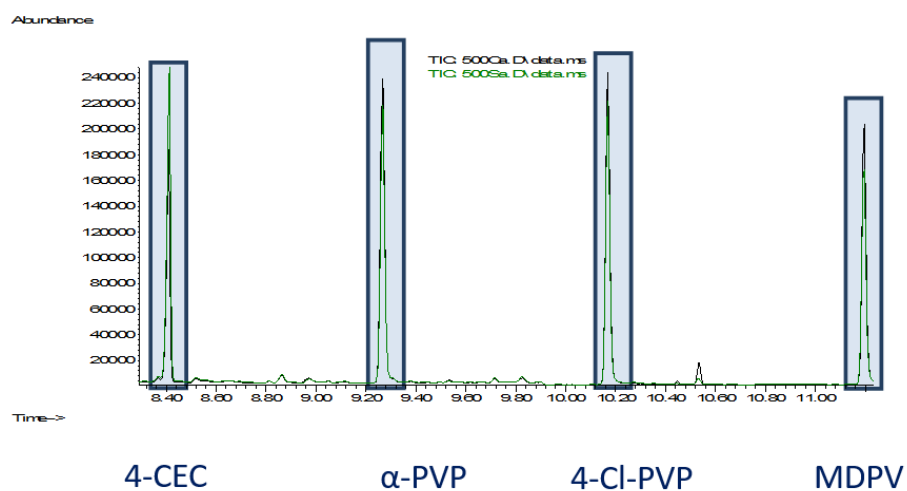


Figura 6.83: Cromatogramas de amostras extraídas antes e depois da extração, a uma concentração de 500 ng/mL.



**Tabela 6.2: Cálculos efetuados no estudo da recuperação média da molécula de 4-CEC.**

**Fortificado Antes da Extração**

Concentração	Área			Média
	4-CEC	IS	4-CEC/IS	
50	107375	613735	0,1750	0,1629
50	96652	604131	0,1600	
50	81774	531916	0,1537	
100	190599	559843	0,3405	0,3567
100	191731	516574	0,3712	
100	194280	542084	0,3584	
500	1109516	598152	1,8549	1,8862
500	1051196	560178	1,8765	
500	1030666	534823	1,9271	

**Fortificado Depois da Extração**

Concentração	Área			Média
	4-CEC	IS	4-CEC/IS	
50	79432	543980	0,1460	0,1398
50	82409	581019	0,1418	
50	68354	519890	0,1315	
100	179443	511412	0,3509	0,3490
100	197535	554981	0,3559	
100	177442	521397	0,3403	
500	987190	532941	1,8523	1,9113
500	1010542	503740	2,0061	
500	927313	494461	1,8754	

**Cálculos Efetuados**

Concentração	(a) A <sub>4-CEC/PI</sub> Fortificado Antes da Extração	(b) A <sub>4-CEC/PI</sub> Fortificado Depois da Extração	Recuperação (a/b) (%)	Recuperação Média (%)	Desvio Padrão (%)
50	0,1750	0,1398	125,17	117,54	7,80
50	0,1600		114,46		
50	0,1537		109,99		
100	0,3405	0,3490	97,54	102,18	4,42
100	0,3712		106,34		
100	0,3584		102,68		
500	1,8549	1,9113	97,05	98,69	1,94
500	1,8765		98,18		
500	1,9271		100,83		

**Tabela 6.3: Cálculos efetuados no estudo da recuperação média da molécula de  $\alpha$ -PVP.**

**Fortificado Antes da Extração**

Concentração	Área			Média
	$\alpha$ -PVP	IS	$\alpha$ -PVP/IS	
50	251306	613735	0,4095	0,3884
50	226031	604131	0,3741	
50	202970	531916	0,3816	
100	447905	559843	0,8001	0,8059
100	425313	516574	0,8233	
100	430578	542084	0,7943	
500	2306812	598152	3,8566	3,8867
500	2212948	560178	3,9504	
500	2060786	534823	3,8532	

**Fortificado Depois da Extração**

Concentração	Área			Média
	$\alpha$ -PVP	IS	$\alpha$ -PVP/IS	
50	215954	543980	0,3970	0,3924
50	221220	581019	0,3807	
50	207639	519890	0,3994	
100	470703	511412	0,9204	0,9237
100	514829	554981	0,9277	
100	481208	521397	0,9229	
500	2106754	532941	3,9531	4,1192
500	2190430	503740	4,3483	
500	2005666	494461	4,0563	

**Cálculos Efetuados**

Concentração	(a) A $\alpha$ -PVP/PI Fortificado Antes da Extração	(b) A $\alpha$ -PVP/PI Fortificado Depois da Extração	Recuperação (a/b) (%)	Recuperação Média (%)	Desvio Padrão (%)
50	0,4095	0,3924	104,36	98,99	4,75
50	0,3741		95,35		
50	0,3816		97,25		
100	0,8001	0,9237	86,62	87,25	1,66
100	0,8233		89,14		
100	0,7943		86,00		
500	3,8566	4,1192	93,62	94,36	1,34
500	3,9504		95,90		
500	3,8532		93,54		

**Tabela 6.4: Cálculos efetuados no estudo da recuperação média da molécula de 4-Cl-PVP.**

**Fortificado Antes da Extração**

Concentração	Área			Média
	4-Cl-PVP	IS	4-Cl-PVP/IS	
50	244330	613735	0,3981	0,3870
50	231311	604131	0,3829	
50	202161	531916	0,3801	
100	436847	559843	0,7803	0,7841
100	411926	516574	0,7974	
100	419854	542084	0,7745	
500	2221956	598152	3,7147	3,7483
500	2135840	560178	3,8128	
500	1988092	534823	3,7173	

**Fortificado Depois da Extração**

Concentração	Área			Média
	4-Cl-PVP	IS	4-Cl-PVP/IS	
50	211465	543980	0,3887	0,3829
50	216883	581019	0,3733	
50	201040	519890	0,3867	
100	451205	511412	0,8823	0,8858
100	494777	554981	0,8915	
100	460697	521397	0,8836	
500	2017375	532941	3,7854	3,9044
500	2065081	503740	4,0995	
500	1892904	494461	3,8282	

**Cálculos Efetuados**

Concentração	(a) A 4-Cl-PVP/PI Fortificado Antes da Extração	(b) A 4-Cl-PVP/PI Fortificado Depois da Extração	Recuperação (a/b) (%)	Recuperação Média (%)	Desvio Padrão (%)
50	0,3981	0,3829	103,97	101,07	2,53
50	0,3829		99,99		
50	0,3801		99,26		
100	0,7803	0,8858	88,09	88,52	1,34
100	0,7974		90,02		
100	0,7745		87,44		
500	3,7147	3,9044	95,14	96,00	1,43
500	3,8128		97,65		
500	3,7173		95,21		

**Tabela 6.5: Cálculos efetuados no estudo da recuperação média da molécula de MDPV.**

**Fortificado Antes da Extração**

Concentração	Área			Média
	MDPV	IS	MDPV/IS	
50	249277	613735	0,4062	0,3723
50	220787	604131	0,3654	
50	183671	531916	0,3453	
100	409555	559843	0,7316	0,7226
100	373575	516574	0,7232	
100	386500	542084	0,7130	
500	2124322	598152	3,5515	3,5782
500	2042975	560178	3,6470	
500	1891197	534823	3,5361	

**Fortificado Depois da Extração**

Concentração	Área			Média
	MDPV	IS	MDPV/IS	
50	201699	543980	0,3708	0,3685
50	210795	581019	0,3628	
50	193427	519890	0,3721	
100	415089	511412	0,8117	0,8226
100	459192	554981	0,8274	
100	432162	521397	0,8289	
500	1885655	532941	3,5382	3,5694
500	1862010	503740	3,6964	
500	1717571	494461	3,4736	

**Cálculos Efetuados**

Concentração	(a) $A_{MDPV/PI}$ Fortificado Antes da Extração	(b) $A_{MDPV/PI}$ Fortificado Depois da Extração	Recuperação (a/b) (%)	Recuperação Média (%)	Desvio Padrão (%)
50	0,4062	0,3685	110,21	101,02	8,41
50	0,3654		99,16		
50	0,3453		93,69		
100	0,7316	0,8226	88,93	87,84	1,13
100	0,7232		87,91		
100	0,7130		86,67		
500	3,5515	3,5694	99,50	100,25	1,68
500	3,6470		102,17		
500	3,5361		99,07		

## Anexo M: Avaliação do Fenómeno de Arrastamento (*Carryover*)

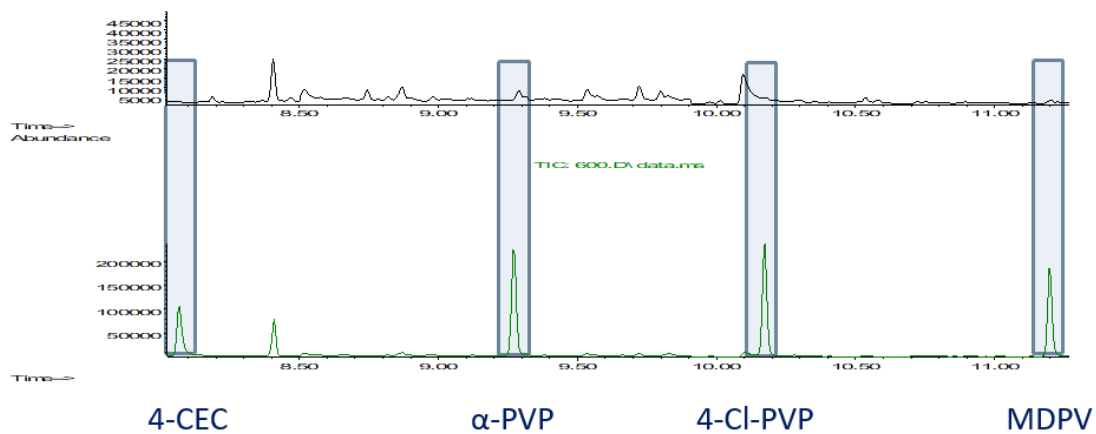


Figura 6.84: Comparação de um cromatograma de uma alíquota de sangue branco (cima) com uma alíquota de sangue branco fortificada com 600 ng/mL das catinonas em estudo.

## Anexo N: Análise de Amostras Reais

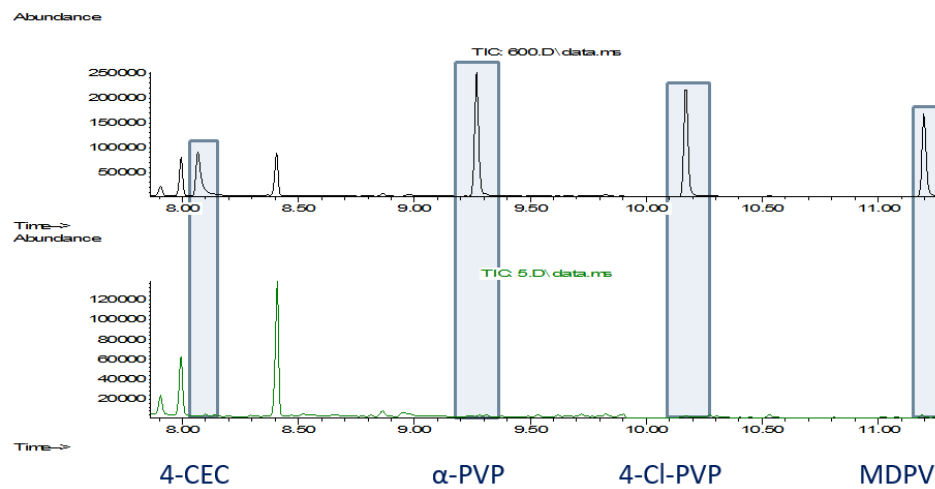


Figura 6.85: Comparação entre uma amostra branca fortificada com 600 ng/mL da mistura de cinco cationonas (cima) com a amostra real número 5.

## Anexo O: Aplicação do Procedimento de Extração a Amostras de Urina

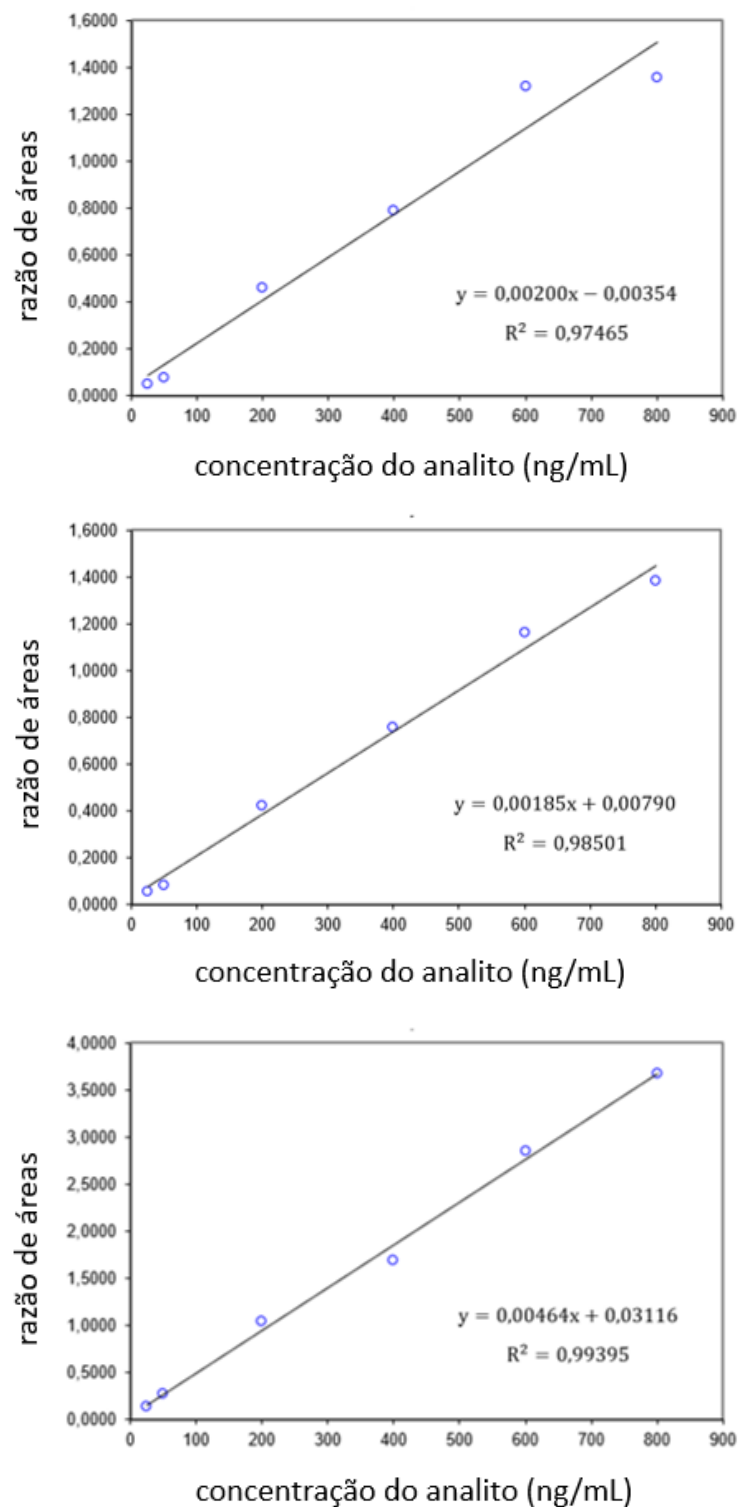


Figura 6.86: Curvas de calibração da  $\alpha$ -PVP (em cima), da 4-Cl-PVP (a meio) e da MDPV (em baixo) obtidas através dos resultados da aplicação do método validado em sangue para amostras de urina.